



ISSN 1516-4691

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária*

*Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental*

*Ministério da Agricultura e do Abastecimento*

# **INDICADORES BIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DA QUALIDADE DO SOLO**

**Manual Técnico**

**Coordenadores:**

Rosa Toyoko Shiraishi Frighetto

Pedro José Valarini

Jaguariúna, SP

2000

## EMBRAPA MEIO AMBIENTE - Documentos 21

Exemplares dessa publicação podem ser solicitados à:

### **Embrapa Meio Ambiente**

Rodovia SP 340 - km 127,5 - Tanquinho Velho  
Caixa Postal 69 13820-000, Jaguariúna, SP  
Fone: (19) 3867-8750 Fax: (19) 3867-8740  
*sac@cnpma.embrapa.br*  
*www.cnpma.embrapa.br*

### **Fundação de Estudos e Pesquisas em Agronomia, Medicina, Veterinária e Zootecnia - FUNEP**

Via de acesso Professor Paulo Donato Castellane, s/n  
Bairro Rural 14884-900 - Jaboticabal, SP  
Fone: (16) 323-1322 Fax: (16) 323-2852  
*livraria@funep.com.br*  
*www.funep.com.br*

**Comitê de Publicações:** Magda Aparecida de Lima, Aldemir Chaim, Célia Maria M. de Souza Silva,  
Franco Lucchini, Júlio Ferraz de Queiroz e Maria Cristina Tordin.

### **Coordenação Editorial**

Maria Cristina Tordin e Regina Lúcia Siewert Rodrigues - Embrapa Meio Ambiente

### **Revisão**

Maria Cristina Tordin

### **Normalização bibliográfica**

Maria Amélia de Toledo Leme

### **Diagramação e editoração**

Franco Ferreira de Moraes

### **Projeto gráfico**

Franco Ferreira de Moraes

### **Foto da capa**

Luiz Toledo de Barros Rizzo

### **Tratamento das ilustrações**

Franco Ferreira de Moraes

### **1ª edição**

1ª impressão (2000): 400 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,  
constitui violação do Copyright<sup>©</sup> (Lei nº. 9610).

CIP. Brasil. Catalogação-na-publicação  
Embrapa Meio Ambiente

---

FRIGHETTO, R. T.S.; VALARINI, P.J., Coords. **Indicadores  
biológicos e bioquímicos da qualidade do solo: manual  
técnico.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000.  
198p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 21).

CDD - 631.4

---

© Embrapa Meio Ambiente, 2000

# PREFÁCIO

Os avanços na tecnologia e na industrialização, associados às mudanças introduzidas no manejo agrícola, trouxeram consigo não somente benefícios ao ser humano mas também problemas ambientais. Para atender a esta nova demanda, a microbiologia e a bioquímica, como dois integrantes da ciência ambiental, precisaram buscar novos prismas de análise para solucionar questões relacionadas às práticas agrícolas, à ecologia microbiana do solo, à ecotoxicologia e aos diversos aspectos da biotecnologia. Esse novo desafio precisou englobar também tecnologias microbianas associadas às rizosferas, aplicadas, por exemplo, na reabilitação de solos degradados. O conhecimento de métodos e seu embasamento teórico é fundamental para o sucesso do trabalho e para a cooperação com outras áreas correlatas da ciência ambiental.

O grande desafio é desenvolver ou adaptar métodos para monitorar e avaliar o impacto antropogênico sobre os processos biológicos do solo e sobre os organismos que nele habitam, em condições de campo. Devido à complexidade das propriedades biológicas e bioquímicas, qualquer índice de qualidade do solo deve incluir diversas variáveis dessas áreas para que estas possam refletir a realidade dos complexos processos que compõem a qualidade do solo. Esses parâmetros devem, também, atender às necessidades dos estudos, como: análise de risco causado pelo uso de pesticidas em solos aráveis; análise e previsão de risco pelo uso de lodo de esgoto, composto, etc; monitoramento do impacto causado pelo uso da terra e predição das mudanças na qualidade do solo em decorrência da adoção de novas práticas, impacto causado pelo derramamento intencional ou acidental de compostos químicos, avaliação da melhoria na qualidade do solo após sua remediação, ou na caracterização de diferentes solos segundo critérios físico-químicos, biológicos, bioquímicos etc.

O tratamento desses dados também precisou buscar uma nova filosofia de análise para atender a essa demanda tão complexa, incorporando-se, para tanto, a ferramenta matemática de análise multivariada de dados, descrita em um dos capítulos deste manual.

O presente manual descreve métodos e técnicas de análise dos indicadores biológicos e bioquímicos normalmente usados para compor os índices de qualidade do solo, interfaceando, para tanto, a biologia, a microbiologia, a química e a bioquímica do solo, cujos conceitos e métodos experimentais foram adotados em nossos laboratórios.

*Rosa Toyoko Shiraishi Frighetto*  
*Pedro José Valarini*

# SUMÁRIO

**COLABORADORES, 9**

**RECOMENDAÇÕES ESPECIAIS, 11**

**I. ESTRATÉGIAS PARA ANÁLISE  
INTEGRADA DO SOLO, 13**

**II. MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS  
NA ANÁLISE INTEGRADA DE DADOS, 19**

**III. DETERMINAÇÃO DA UMIDADE, PH  
E CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE ÁGUA DO SOLO, 37**

**IV. PROBLEMAS ENCONTRADOS  
NA AVALIAÇÃO DE MICRORGANISMOS DO SOLO, 41**

**V. MÉTODOS BÁSICOS PARA CONTAGEM  
DE PATÓGENOS DO SOLO: MEIOS SELETIVOS  
PARA ISOLAMENTO, AVALIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO, 45**

**VI. DETERMINAÇÃO DE ACTINOMICETOS,  
LEVEDURAS, BACTÉRIAS ESPORULANTES  
E SOLUBILIZADORES DE FOSFATO NO SOLO, 53**

**VII. AVALIAÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS  
ARBUSCULARES E SUA IMPORTÂNCIA AMBIENTAL, 61**

**VIII. METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO  
DE FIXADORES SIMBIÓTICOS DE NITROGÊNIO DO SOLO, 77**

**IX. A IMPORTÂNCIA DA CELULASE  
NA DEGRADAÇÃO DE MATÉRIA ORGÂNICA, 89**

**X. USO DE CROMÓFOROS NA DETECÇÃO  
DE ENZIMAS EXTRACELULARES DE FUNGOS, 99**

**XI. ANÁLISE DE FOSFATASE ÁCIDA  
E ALCALINA: COMPONENTE DO ÍNDICE  
DE QUALIDADE BIOQUÍMICA DO SOLO, 103**

**XII. MÉTODOS PARA DETECÇÃO  
DAS MUDANÇAS QUÍMICAS NA RIZOSFERA, 111**

**XIII. ANÁLISE DA ATIVIDADE  
DE DESIDROGENASE, 119**

**XIV. DETERMINAÇÃO DE MICRORGANISMOS  
METABOLICAMENTE ATIVOS EM AMBIENTES NATURAIS,  
POR CTC (5-CYANO-2,3-DITOLUYL TETRAZOLIUM CHLORIDE), 125**

**XV. ESTIMATIVA DA ATIVIDADE MICROBIANA:  
MÉTODO DE HIDRÓLISE DO DIACETATO DE FLUORESCEÍNA, 133**

**XVI. ESTIMATIVA DA ATIVIDADE  
MICROBIANA DO SOLO POR CROMATOGRAFIA GASOSA, 139**

**XVII. TEOR DE ERGOSTEROL PARA ESTIMAR  
A COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE FÚNGICA DO SOLO, 151**

**XVIII. ANÁLISE DA BIOMASSA MICROBIANA  
EM CARBONO: MÉTODO DE FUMIGAÇÃO-EXTRAÇÃO, 157**

**XIX. DETERMINAÇÃO  
DE POLISSACARÍDEOS DE ORIGEM MICROBIANA  
E SUA IMPORTÂNCIA NA ESTRUTURAÇÃO DO SOLO, 167**

**XX. ESTIMATIVA DA QUALIDADE  
DE RESÍDUOS VEGETAIS INCORPORADOS AO SOLO  
E SUA IMPORTÂNCIA NA CICLAGEM DE NUTRIENTES, 175**

**XXI. PERFIL DE ENRAIZAMENTO  
COMO INDICADOR BIOLÓGICO DA QUALIDADE FÍSICA DO SOLO, 193**

# COLABORADORES

**Adriana Parada Dias da Silveira**

Centro de Solos e Recursos Agro - IAC  
Caixa Postal 28  
13001-970 Campinas-SP  
*apdsil@iac.barao.br*

**Arquimedes Lavorenti**

Departamento de Química - ESALQ/USP  
Caixa Postal 9  
13418-900 Piracicaba-SP  
*Alavoren@carpa.ciagri.usp.br*

**Heloísa Ferreira Filizola**

Embrapa Meio Ambiente  
Caixa Postal 69  
13820-000 Jaguariúna-SP  
*filizola@cnpma.embrapa.br*

**Itamar Soares de Melo**

Embrapa Meio Ambiente  
Caixa. Postal 69  
13820-000 Jaguariúna-SP  
*itamar@cnpma.embrapa.br*

**Jane L. Faull**

Dep. of Biology, Birkbeck College, University of London  
*j.nicklin@biology.bbk.ac.uk*

**Marcelo Martins de Sena**

Instituto de Química - Unicamp  
Caixa Postal 6154  
13083-970 Campinas-SP  
*marcsen@iqm.unicamp.br*

**Maria José Valarini**

PqC - Instituto de Zootecnia  
Caixa Postal 60  
13460-000 Nova Odessa-SP  
*mjvalarini@izsp.br*

**Milton Ricardo de Abreu Roque**  
Embrapa Meio Ambiente  
Caixa Postal 69  
13820-000 Jaguariúna-SP  
*mroque@cnpma.embrapa.br*

**Nelson Frighetto**  
Laboratório de Síntese Orgânica - CPQBA/UNICAMP  
Caixa Postal 6171  
13081-970 Campinas-SP  
*frighetto@cpqba.unicamp.br*

**Pedro José Valarini**  
Embrapa Meio Ambiente  
Caixa Postal 69  
13820-000 Jaguariúna-SP  
*valarini@cnpma.embrapa.br*

**Regina Teresa Rosim Monteiro**  
Laboratório de Ecotoxicologia - CENA/USP  
Caixa Postal 96  
13400-970 Piracicaba-SP  
*monteiro@cena.usp.br*

**René Peter Schneider**  
Instituto de Ciências Biomédicas - USP  
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374  
05508-900 São Paulo-SP  
*Schneide@icb.usp.br*

**Ronei Jesus Poppi**  
Instituto de Química - Unicamp  
Caixa Postal 6154  
13083-970 Campinas-SP  
*ronei@iqm.unicamp.br*

**Rosa Toyoko Shiraishi Frighetto**  
Embrapa Meio Ambiente  
Caixa Postal 69  
13820-000 Jaguariúna-SP  
*rosa@cnpma.embrapa.br*

**Shirlei Scramin**  
Embrapa Meio Ambiente  
Caixa Postal 69  
13820-000 Jaguariúna-SP  
*scramin@cnpma.embrapa.br*

# RECOMENDAÇÕES ESPECIAIS

Os laboratórios da Embrapa Meio Ambiente possuem “Manual de Normas e Procedimentos de Segurança” próprios. Vale ressaltar que cada laboratório, pelas suas particularidades, demanda normas de segurança e de gerenciamento diferenciadas. Descrevemos aqui apenas algumas recomendações básicas para a condução eficiente dos trabalhos com a devida precaução.

**USAR AVENTAL NOS LABORATÓRIOS. SEMPRE**

## Manipulação de reagentes

- Qualquer reagente ou solução deve SEMPRE estar devidamente rotulado e identificado (nome do produto, concentração, data do preparo e quem preparou).
- Ler SEMPRE o conteúdo do rótulo para se informar sobre as recomendações ou consultar literatura especializada, antes de manipular qualquer produto.
- Manipular reagentes voláteis SOMENTE dentro da capela com exaustão, para prevenir a inalação de gases tóxicos.
- Usar luvas e óculos de segurança para manipular substâncias tóxicas. Usar máscara para gases voláteis, mesmo operando na capela.
- NUNCA pipetar com a boca. Usar acessórios apropriados.
- Para diluir um ácido, SEMPRE derramá-lo sobre a água.

# Manejo do Lixo Laboratorial

- Acondicionar restos de soluções e produtos de reações em recipientes apropriados, devidamente identificados, para posterior descarte (ou incineração). Ter o cuidado em não misturar substâncias incompatíveis. Consultar um técnico de segurança.
- Nunca despejar substâncias químicas nas pias.
- Solventes devem ser acondicionados em bombonas separados das soluções aquosas (contendo, por exemplo, metais e substâncias tóxicas).
- Acondicionar dejetos sólidos (poliacrilamida e plásticos contaminados) no recipiente específico.
- Os meios de cultura utilizados nos ensaios devem sofrer autoclavagem antes de serem descartados.
- Agulhas, lâminas e ponteiros devem ser depositadas em “lixos especiais” e NUNCA em cestos para “lixos comuns”.

Uma orientação sobre descarte seguro de pequenas quantidades de substâncias químicas de uso nos laboratórios pode ser encontrada no catálogo Aldrich Catalogue Handbook of Fine Chemicals. Para informações mais detalhadas, consultar as seguintes bibliografias:

PITT, M.J. et al. **Handbook of laboratory waste disposal**. Chichester: Ellis Horwood, 1985.

ARMOUR, M.A. **Hazardous laboratory chemicals disposal guide**. Boca Raton: CRC Press, 1991.

LUNN, G. et al. **Destruction of hazardous chemicals in the laboratory**. 2. ed. Chichester: J. Wiley, 1994.

# I. ESTRATÉGIAS PARA ANÁLISE INTEGRADA DO SOLO

Rosa Toyoko Shiraishi Frighetto  
Pedro José Valarini

## **Quais parâmetros definem a qualidade do solo?**

Devido à sua importância, muitas tentativas de definição da qualidade do solo estão descritas na literatura (Doran & Parkin, 1994; Persson & Otabbong, 1994), bem como sugestões de métodos e estratégias para sua caracterização (Domsch et al., 1983; Brookes, 1993; Doelman & Vonk, 1994; León & van Gestel, 1994; Kennedy & Papendick, 1995a; Kennedy & Smith, 1995b; Torstensson, 1993; Torstensson, 1997). Doran & Parkin (1994) sugeriram que a qualidade do solo deve ser definida como sendo “a capacidade, de um dado solo, em funcionar no ecossistema para sustentar a produtividade biológica, manter a qualidade ambiental e promover a saúde do animal e da planta”.

A qualidade do solo pode melhorar ou deteriorar dependendo dos fatores que a influenciam. Porém existem aqueles fatores que são fixos e, portanto,

não podem ser modificados, tais como: geológico, topográfico, climático e o tempo.

Compostos xenobióticos emitidos por fontes locais ou aqueles presentes em locais de descarte são, normalmente, restritos em termos espaciais. Mas estes podem se tornar muito concentrados a ponto de afetarem a qualidade do solo. Além do mais, esses compostos, quando o atingem podem ser transportados pelo processo de adsorção/dessorção, ser transformados ou não ao longo do perfil de solo e atingir as águas superficiais e subterrâneas, dependendo das características deste.

Outro parâmetro a ser considerado é o papel dos microporos na sorção e liberação de poluentes (Bergström & Stenström, 1998) e sua importância na biodisponibilidade dos compostos xenobióticos, sendo necessários, portanto, estudos mais profundos. Os microporos, que ocupam a interface entre as três fases do solo (sólido, líquido e ar), abrigam muitas das respostas relacionadas à questão de lixiviação e transporte de compostos químicos pelo perfil do solo.

O ecossistema do solo pode, também, sofrer distúrbios em consequência das práticas agrícolas, como o preparo, fertilização, controle de doenças e pragas, tipos de cultura, processo de colheita etc.

O grande desafio é desenvolver ou adaptar métodos para monitorar e avaliar o impacto antropogênico sobre os processos biológicos do solo e sobre os organismos que nele habitam, em condições de campo. Qualquer índice de qualidade do solo deve incluir, além dos índices convencionais e oficiais (físico e químico), diversas variáveis biológicas e bioquímicas para que, em conjunto, possam refletir os complexos processos que afetam a qualidade do solo. Esses parâmetros, analisados de forma integrada, devem, também, atender às necessidades pertinentes ao estudo e ao ecossistema.

No caso dos estudos ecotoxicológicos, a minhoca foi selecionada como parâmetro animal, e também outros invertebrados foram sugeridos para testes

laboratoriais de efeitos indiretos. Porém ainda não existe um método validado para testes que possam ser adotados em condições de campo. Estudos baseados no comportamento, reprodução, mudança na comunidade etc. foram sugeridos, mas estes apresentam problemas operacionais, como alto custo e consumo de tempo.

Os microbiologistas, por outro lado, utilizaram métodos que refletem a estrutura da comunidade (Bååth et al., 1998) e atividade microbiana (Torstensson et al., 1998; Palmborg et al., 1998; Pell et al., 1998; Stenström et al., 1998), porém estes testes ainda apresentam variações na sua sensibilidade (Domsch et al., 1983; Dighton, 1997). Há quem acredite que a determinação da variabilidade de micorrização por profundidade possa abrir novos horizontes de pesquisa e o funcionamento do ecossistema seria utilizado para criar relevantes sistemas de teste (Kling & Jacobsen, 1998). Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) constituem a interface viva entre o solo e as raízes de plantas para o transporte de nutrientes. Estes são considerados grupos de microrganismos do solo de importância direta na absorção de nutrientes pelas plantas herbáceas. Os FMA também contribuem na formação de agregados do solo e na proteção de plantas contra a estiagem e os patógenos do solo. Portanto, na avaliação da qualidade do solo é importante considerar o enfoque qualitativo e quantitativo desse parâmetro (Kling & Jacobsen, 1998).

As enzimas estão presentes no solo na forma biótica associada aos microrganismos viáveis ou às faunas do solo e na forma não associada às células vivas (abióticas), como enzimas extracelulares, células mortas ou complexadas aos colóides orgânicos e minerais. A atividade enzimática no solo tem um papel importante por participar da catálise de inúmeras reações necessárias para o ciclo de vida de microrganismos no solo, para a decomposição de resíduos orgânicos no ciclo de nutrientes e na formação da matéria orgânica e estrutura do solo. As enzimas apresentam grande potencial como indicadoras da qualidade do solo por estas serem sensíveis às variações induzidas pelos fatores ambiental e de manejo, e os procedimentos de sua análise são relativamente simples e rápidos (Dick, 1994)

Sendo o solo uma matriz muito heterogênea, o método de amostragem deve levar em consideração a presença de grande variabilidade. Seria desejável que fosse elaborado um procedimento geoestatístico para mapear a distribuição dos contaminantes nos solos (caracterização do problema) e que este fosse utilizado como uma ferramenta propícia para acompanhamento amostral e dos resultados de monitoração.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BÅÅTH, E.; FROSTEGARD, Å.; DÍAZ-RAVIÑA, M.; TUNLID, A. Microbial community based measurements to estimate heavy metal effects in soil: the use of phospholipid fatty acid patterns and bacterial community tolerance. **Ambio**, v.27, p.58-61, 1998.
- BERGSTRÖM, L.; STENSTRÖM, J. Environmental fate of chemicals in soil. **Ambio**, v.27, p.16-23, 1998.
- BROOKES, P. C. The potential of microbiological properties as indicators in soil pollution monitoring. In: SCHULIN, R., ed. **Soil monitoring: early detection and surveying of soil contamination and degradation**. Basel: Birkhäuser Verlag, 1993. p.229-254.
- DICK, R.P. Soil enzyme activities as indicators of soil quality. In: DORAN, J.W.; COLEMAN, D.C.; BEZDICEK, D.F.; STEWART, B.A., ed. **Defining soil quality for a sustainable environment: proceedings of a symposium**. Madison: Soil Science Society of America, 1994. p.107-124. (SSSA Special Publication, 35).
- DIGHTON, J. Is it possible to develop microbial test systems to evaluate pollution effects on soil nutrient cycling? In: VAN STRAALLEN, N.M.; LØKKE, H., ed. **Ecological risk assessment of contaminants in soil**. London: Chapman & Hall, 1997. p.51-69.
- DOELMAN, P.; Vonk, J.W. Soil microorganisms of global importance to consider ecotoxicology in an economical and ecological way. In: DONKER, M. H. E.; EIJSKERS, H.; HEIMBACH, F., ed. **Ecotoxicology of soil organisms**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1994. p.91-104.
- DOMSCH, K. H.; JAGNOW, G.; ANDERSON, T.-H. An ecological concept for assessment of side-effects of agrochemicals on soil microorganisms. **Residue Reviews**, v.86, p.65-105, 1983.
- DORAN, J. W.; PARKIN, T.B. Defining and assessing soil quality. In: DORAN, J.W.; COLEMAN, D.C.; BEZDICEK, D.F.; STEWART, B.A., ed. **Defining soil quality for a sustainable environment: proceedings of a symposium**. Madison: Soil Science Society of America, 1994. p.3-21. (SSSA Special Publication, 35).

- KENNEDY, A. C.; Papendick, R.I. Microbial characteristics of soil quality. **Journal of Soil and Water Conservation**, v.50, p.243-248, 1995.
- KENNEDY, A. C.; Smith, K.L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soil. **Plant and Soil**, v. 170, p.75-86, 1995.
- KLING, M.; JACOBSEN, I. Arbuscular mycorrhiza in soil quality assessment. **Ambio**, v.27, p.29-34, 1998.
- LEÓN, C. D.; VAN GESTEL., C.A.M. **Selection of a set of laboratory ecotoxicology tests for the effects assessment of chemicals in terrestrial ecosystems**. Amsterdam: Vrije Universiteit, 1994.
- PALMBORG, C.; BRINGMARK, L.; BRINGMARK, E.; NORDGREN, A. Multivariate analysis of microbial activity and soil organic matter at a forest site subjected to low-level heavy metal contamination. **Ambio**, v.27, p.53-57, 1998.
- PELL, M.; STENBERG, B.; TORSTENSSON, L. Potential denitrification and nitrification tests for evaluation of pesticide effects in soil. **Ambio**, v.27, p.24-28, 1998.
- PERSSON, J.; OTABBONG, E. Soil fertility and regulating factors. In: **Fertility of cultivating soils**. Stockholm: Swedish Environmental Protection Board, 1994. p.9-69.
- STENSTRÖM, J.; STENBERG, B.; JOHANSSON, M. Kinetics of substrate-induced respiration (SIR): theory. **Ambio**, v.27, p.35-39, 1998.
- TORSTENSSON, L. **Soil biological variables in environmental hazard assessment: guidelines**. Stockholm: Swedish Environmental Protection Agency, 1993. 166p.
- TORSTENSSON, L. Microbial assays in soil. In: TARRADELLAS, J. B.; BITTON, G.; ROSSEL, D., ed. **Soil ecotoxicology**. Boca Raton: CRC Press/ Lewis Publisher, 1997. p.207-234.
- TORSTENSSON, L.; PELL, M.; STENBERG, B. Need of strategy for evaluation of arable soil quality. **Ambio**, v. 27, p.4-8, 1998.



# II. MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS NA ANÁLISE INTEGRADA DE DADOS

Ronei Jesus Poppi  
Marcelo Martins de Sena

## Introdução

Com a crescente sofisticação das técnicas instrumentais de análise química, impulsionada pelo avanço de microprocessadores e microcomputadores nos laboratórios, técnicas de tratamento de dados mais complexas do ponto de vista matemático e estatístico tornaram-se uma realidade (Bruns & Faigle, 1985).

A análise de dados é uma parte essencial em todo experimento, sendo univariada quando somente uma variável é medida sistematicamente nas várias amostras. Há muito tempo a estatística univariada vem sendo aplicada a problemas químicos, mas a sua utilização tornou-se muito limitada. Nas últimas décadas, a análise multivariada foi introduzida no tratamento de dados químicos, ganhando rapidamente popularidade e dando origem a uma nova disciplina, batizada *Quimiometria*. O modelo estatístico

dos métodos multivariados leva em consideração a correlação entre muitas variáveis medidas simultaneamente, permitindo a extração de uma quantidade muito maior de informação.

A seguir, será descrito, como exemplo, o estudo da utilização de métodos quimiométricos em análise de solos. O solo é uma estrutura complexa formada pela influência de fatores geológicos, topográficos, climáticos, temporais e antropogênicos; é também a parte mais importante da geosfera, de onde provém a maior parte dos nossos alimentos. Além disso, ele funciona como uma espécie de filtro ambiental para a purificação da água e do ar (Torstensson et al., 1998).

O interesse maior na análise de solos está centrado nos parâmetros químicos (concentração de metais e nutrientes, pH etc.), físicos (compactação, umidade etc.) e biológicos (processos microbianos, etc.), os quais são considerados indicadores de sua qualidade. Dentre os parâmetros do solo, o mais estudado é a matéria orgânica (MO). Ela controla muitas de suas propriedades e é um fator central na manutenção de sistemas agrícolas sustentáveis (conceito de manejo do solo) e no controle da erosão. As substâncias húmicas (Piccolo, 1996), polímeros naturais formados pela atividade de microrganismos durante a decomposição de plantas e animais, são uma parte da MO que exerce importante papel no transporte, biodisponibilidade e complexação de nutrientes e metais pesados no solo. Além destes, outro grande interesse na análise de solos é medir sua contaminação por pesticidas e metais pesados. Para o acompanhamento de todos esses parâmetros, a química analítica tem contado, nos últimos anos, com um grande avanço no desenvolvimento de técnicas instrumentais, tais como espectroscopia e cromatografia.

Os métodos quimiométricos possuem um enorme potencial no tratamento das questões descritas acima. Entretanto, até a segunda metade dos anos 80, a sua presença na literatura era escassa. A partir dos anos 90, nota-se um aumento significativo de suas aplicações, elevando a capacidade de se extrair informações dos dados provenientes da análise de solos. Com isto,

pode-se afirmar que está em curso um processo de substituição de muitos métodos tradicionais de análise univariados por métodos multivariados. Mas esse processo está ainda em seu começo e há a necessidade de uma ampla divulgação, para que cada vez mais, maior número de pesquisadores tomem contato com esta ferramenta de otimização, que é a quimiometria.

## Métodos descritivos exploratórios

### 1. Análise de Componentes Principais (PCA)

A Análise dos Componentes Principais, PCA (Geladi & Kowalski, 1986; Martens & Naes, 1989; Zampronio, 1998) (do inglês "Principal Component Analysis"), possui por finalidade básica a redução de dados a partir de combinações lineares das variáveis originais.

A PCA decompõe uma matriz de dados  $X$  (onde as  $n$  linhas são as amostras e as  $m$  colunas, as variáveis) de posto ("rank")  $h$ , como uma soma de matrizes de posto igual a 1, como na equação 1:

$$X = M_1 + M_2 + M_3 + \dots + M_h \quad (1)$$

onde o posto expressa o número de vetores linearmente independentes de uma matriz.

Essas novas matrizes de posto um são produtos de vetores chamados "scores",  $t_h$ , e "loadings",  $p_h$ . Estes "scores" e "loadings" podem ser calculados por um ajuste de mínimos quadrados. A operação é equivalente ao cálculo de autovetores e autovalores de uma matriz por "Singular Value Decomposition" (SVD). A equação pode ser representada na forma vetorial,

$$X = t_1 p_1^* + t_2 p_2^* + \dots + t_h p_h^* \quad (2)$$

na forma matricial,

$$X = TP' \quad (3)$$

ou graficamente, como na Figura 1.

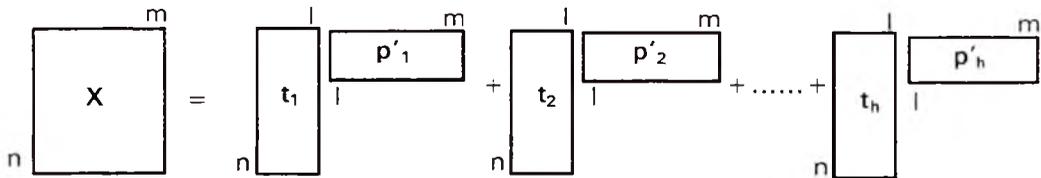


Figura 1. Representação gráfica da somatória dos produtos dos vetores *scores* e *loadings*.

Para exemplificar  $t_h$  e  $p'_h$ , a Figura 2 ilustra no plano bidimensional duas variáveis,  $x_1$  e  $x_2$ . A Figura 2A mostra uma componente principal (CP), a reta que aponta na direção de maior variabilidade das amostras (pontos 1 a 6) da Figura 2B. Os "scores"  $t_h$  são as projeções das amostras na direção da CP (Fig. 2B) e os "loadings"  $p'_h$  são os cossenos dos ângulos formados entre a CP e cada variável (Fig.2A).

As novas variáveis, as CPs, são ortogonais entre si e, portanto, não correlacionadas. Normalmente, as primeiras CPs explicam a maior parte da variância total contida nos dados e podem ser usadas para representá-los.

A Análise de Fatores é adotada em boa parte da literatura como sinônimo de PCA, porém alguns autores (Jöreskog et al., 1976; Forina et al., 1988) definem esses termos como métodos diferentes, com base no modo como os fatores (ou CPs) são definidos. Na PCA os fatores devem explicar o máximo da variância contida em todas as variáveis observadas, enquanto que na análise de fatores, eles devem explicar o máximo da intercorrelação entre as variáveis. Neste trabalho, de acordo com a maioria da literatura em química, ambos os termos, fatores e CPs, serão tratados como equivalentes.

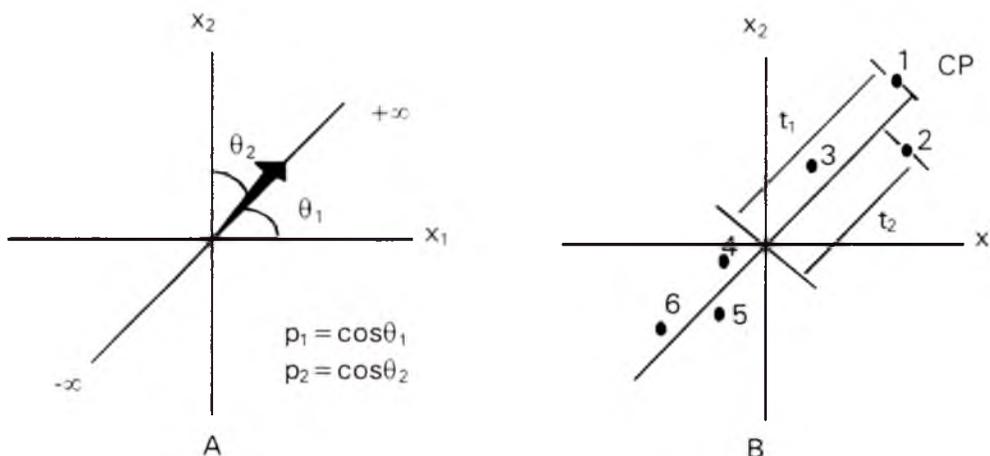


Figura 2. Representação de uma Componente Principal (CP) no caso de duas variáveis: (A) os *loadings* são os ângulos do vetor direção; (B) os *scores* são as projeções das amostras 1-6 na direção da CP. Notar que os dados estão centrados na média.

## 2. Aplicações de métodos exploratórios em análise de solos

A PCA é um método exploratório porque ajuda na elaboração de hipóteses gerais a partir dos dados coletados, contrastando com estudos direcionados nos quais hipóteses prévias são testadas. Ela é capaz de realizar a separação entre a informação importante e a redundante.

Para a análise exploratória, é de fundamental importância entender que os “scores” fornecem a composição das CPs em relação aos objetos (amostras), enquanto os *loadings* fornecem essa mesma composição em relação às variáveis. Como as CPs são ortogonais e, portanto, não correlacionadas, é possível examinar as relações entre os objetos através dos gráficos dos *scores*, projetados nas primeiras CPs, e entre as variáveis, através dos gráficos dos *loadings*. Esses gráficos apresentam informações úteis sobre tendências subjacentes e características da estrutura dos dados, tais como agrupamentos de objetos ou variáveis e caracterização dos chamados *outliers* (amostras mal comportadas, que não se encaixam no modelo). O estudo conjunto de *scores* e *loadings* permite estimar a influência

de cada variável em cada objeto e pode ser feito através dos assim chamados gráficos *biplots*. Nos *biplots*, ambos, *scores* e *loadings*, são normalizados e representados em um mesmo espaço, facilitando, desta maneira, a visualização das relações recíprocas entre objetos, variáveis e CPs.

A aplicação desta ferramenta está exemplificada no estudo da avaliação de propriedades do solo, realizado em duas regiões distintas do estado de São Paulo.

## **2.1 Avaliação de propriedades do solo**

Nenhuma medida isolada, seja biológica, física ou química, poderá dar uma ampla visão da qualidade do solo. Existe, portanto, a necessidade de uma avaliação integrada dos diversos aspectos dessa qualidade (Torstensson et al., 1998).

Esta estratégia foi aplicada no estudo comparativo entre sistemas de manejo do solo que utilizam microrganismos benéficos associados aos restos culturais, aqui chamados sustentáveis, com sistemas que fazem uso intensivo de herbicidas e fungicidas, chamados convencionais (Sena et al., 1998, 1999, 2000). Espera-se que a incorporação de MO e de restos de culturas, combinada com a inoculação de microrganismos benéficos em substituição ao uso de agrotóxicos, proporcione uma melhora nos parâmetros químicos, biológicos e bioquímicos, além de aumentar a estabilidade do solo em comparação com práticas de manejo convencionais.

O primeiro estudo foi realizado em três áreas no município de Suzano (região leste da Grande São Paulo) (Sena et al., 1999, 2000). Na primeira área foram separadas quatro faixas, uma de agricultura sustentável (T1S), uma de pastagem (T2P), uma de agricultura convencional (T3C) e uma de mata nativa (T4M); na segunda área foram separadas duas faixas, uma de agricultura sustentável (T5S) e uma de agricultura convencional (T6C); na

terceira área foram separadas três faixas, uma de agricultura sustentável (T7S), uma de mata nativa (T8M) e uma de agricultura convencional (T9C). Foi analisado o conjunto das nove faixas. Para cada faixa foram coletadas 10 amostras compostas de solo. Para cada amostra foram medidos 21 parâmetros químicos e biológicos: fósforo (P), matéria orgânica (MO), pH, potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), acidez total (H + Al), alumínio (Al), soma de bases (S), capacidade de troca catiônica (CTC), volume de saturação por bases (V), boro (B), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), zinco (Zn), bactérias esporulantes (Bae), actinomicetos (Ac), microrganismos celulolíticos (Cel), teor de carbono em polissacarídeos (Ps) e atividade de desidrogenase (Dh).

A PCA foi aplicada aos valores médios das 10 amostras de cada faixa. Foi construída uma matriz 9x21 (9 faixas x 21 variáveis). Neste tipo de análise, os dados sempre devem ser previamente auto-escalonados (normalizados para média zero e variância um), para assegurar que todas as variáveis contribuam igualmente para o modelo, independente da escala em que foram medidas. Todos os cálculos foram feitos no "software" "MATLAB 5.2", utilizando o pacote "PLS Toolbox 2.0" (Wise & Gallagher, 1998).

O objetivo principal da PCA é a redução da dimensão dos dados originais. Estes são muitas vezes redundantes, porque estão correlacionados. As CPs são calculadas levando em conta essas correlações, mas elas mesmas não estão correlacionadas entre si (por isso, a ortogonalidade entre elas). Neste caso, as 21 variáveis originais devem ser reduzidas a umas poucas novas variáveis independentes (CPs), que expliquem a maior parte da informação relevante, simplificando com isso, a interpretação dos dados e eliminando a informação desnecessária. O sistema original de coordenadas (21 variáveis projetadas em 9 objetos) é transformado, de modo que o eixo da primeira CP esteja na direção do máximo de variância contida nos dados. A segunda CP deve ser ortogonal à primeira e explicar a maior quantidade de variância restante. E assim, sucessivamente, devem ser obtidas as outras CPs. Após a transformação, o analista deve escolher o número de CPs que utilizará em seu modelo. Deve-se ressaltar que o ponto de maior dificuldade na PCA

consiste justamente nesta escolha, não havendo uma regra geral. O analista deve tomar a sua decisão baseado em considerações, tanto do ponto de vista estatístico (quantidade de variância explicada pelo modelo), quanto do ponto de vista físico/químico/biológico (interpretação/significado real das CPs).

Na presente análise, foi escolhido um modelo que, com duas CPs, explica 76% da variância dos dados originais. A terceira CP, que explica 11,3% da variância total, foi considerada sem importância para a interpretação de tendências nos dados. A Tabela 1 mostra a porcentagem de variância explicada por cada CP.

Tabela 1. Porcentagem de variância explicada por cada componente principal (CP). Dados de Suzano.

<b>Número do componente principal</b>	<b>% de variância explicada por esta CP</b>	<b>% Total de variância explicada pelo modelo</b>
1	51.37	51.37
2	24.62	75.99
3	11.32	87.31
4	04.86	92.17
5	03.62	95.80
6	02.31	98.11
7	01.01	99.12
8	00.88	100.00
9	00.00	100.00

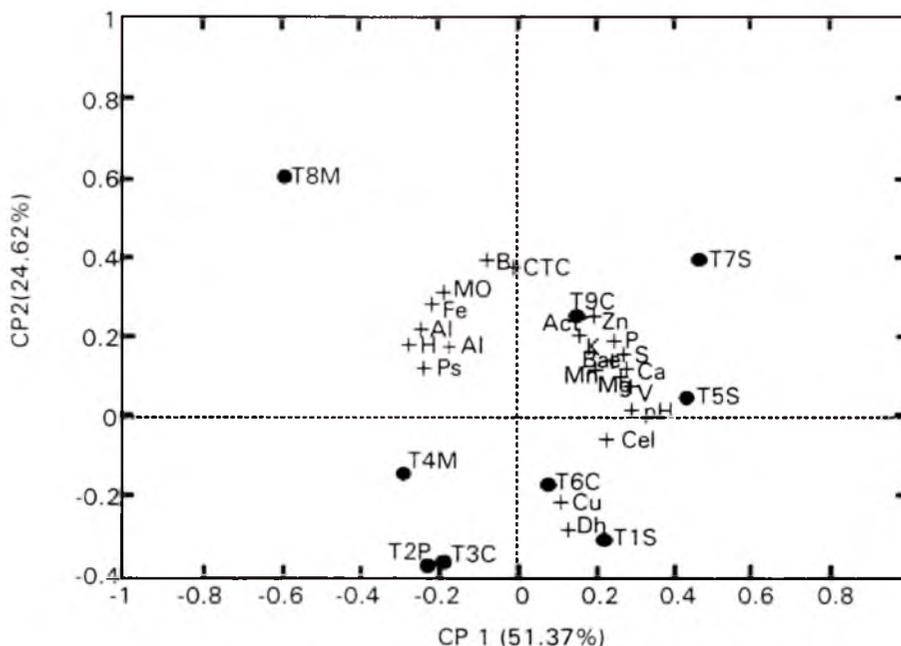


Figura 3A. Resultado da análise de componentes principais (PCA), mostrando as duas primeiras componentes principais para os dados de Suzano: gráfico dos *scores*.

A Figura 3 mostra os gráficos das duas primeiras CPs. O gráfico de *scores* (Fig. 3A) permite a caracterização de tendências entre as faixas. A primeira CP (51,4%) é responsável pela diferenciação entre os tipos de manejo do solo, enquanto a segunda (24,6%) separa as faixas de acordo com a área de origem. Na CP1 as faixas de agricultura sustentável, T1, T5 e T7, apresentam valores positivos, contrastando com as faixas de mata, T4 e T8, que apresentam valores negativos; as faixas de agricultura convencional e pastagem, T2, T3, T6 e T9, apresentam valores intermediários. A CP2 possui valores positivos para as faixas da terceira área (T7-T9), intermediários para a segunda área (T5 e T6) e negativos para a primeira área (T1-T4).

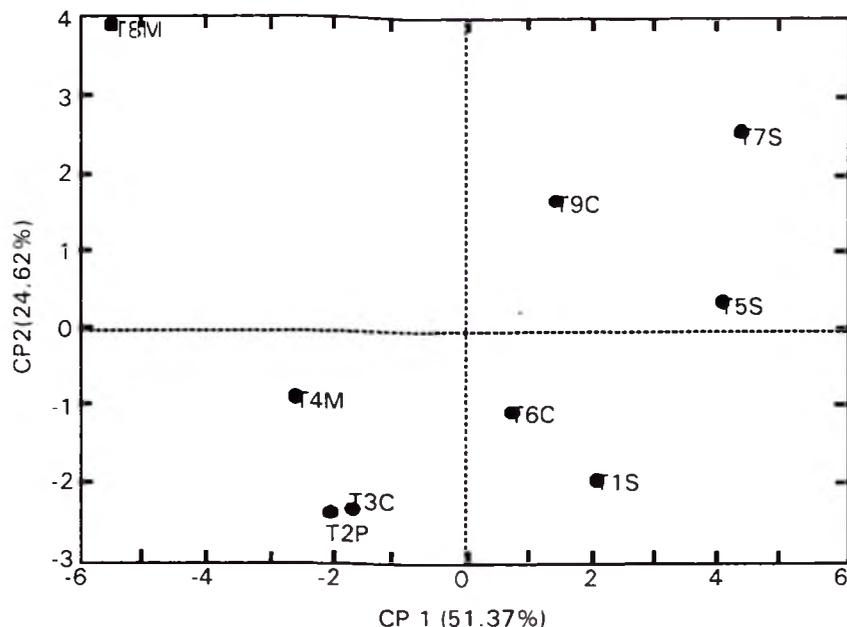


Figura 3B. Gráfico dos *loadings*, para os dados de Suzano.

O gráfico de *loadings* (Fig. 3B) permite a caracterização de tendências entre as variáveis. Observando-se ao longo do eixo da CP1, as variáveis que mais influenciam diretamente nas faixas sustentáveis (valores positivos) são P, pH, Ca, Mg, S, V, Mn, Zn, Bae e Cel, enquanto as variáveis que caracterizam a mata (valores negativos) são MO, H + Al, Al<sup>+3</sup>, Fe e Dh. Pode-se notar, ao longo do eixo da CP2, que as variáveis que mais contribuem para a diferenciação entre as áreas são MO, CTC e B (influenciam diretamente na terceira fazenda – valores positivos na CP2); e Cu e Dh (influenciam na primeira área – valores negativos na CP2). Através dos gráficos *biplots* (Fig. 3C) é possível visualizar conjuntamente as relações entre as CPs, as faixas e as variáveis. No próximo exemplo, a discussão será feita somente através de *biplots*, já que estes condensam toda a informação contida nos gráficos de *scores* e de *loadings*.

Em um segundo estudo foram escolhidas três fazendas no município de Guaíra (região norte do Estado de São Paulo): Macaúba, Lagoa do Fogão e

Cuiabanos (Sena et al., 1998, 2000). Em cada fazenda foram separadas cinco faixas (correspondente a um quarto da área sob pivô central), duas de sistema sustentável, duas de sistema convencional e uma de mata nativa. Para cada faixa foram coletadas 10 amostras compostas do solo. Para cada amostra foram medidos 8 parâmetros biológicos e bioquímicos: pH, leveduras (Lev), actinomicetos (Act), microrganismos celulolíticos (Cel), microrganismos solubilizadores (Sol), teor de carbono em polissacarídeos (Ps) em mg/g de solo, atividade de desidrogenase (Dh) em  $\mu\text{L}$  de H/g de solo e biomassa microbiana (BiM) em  $\mu\text{g}$  de C/g de solo.

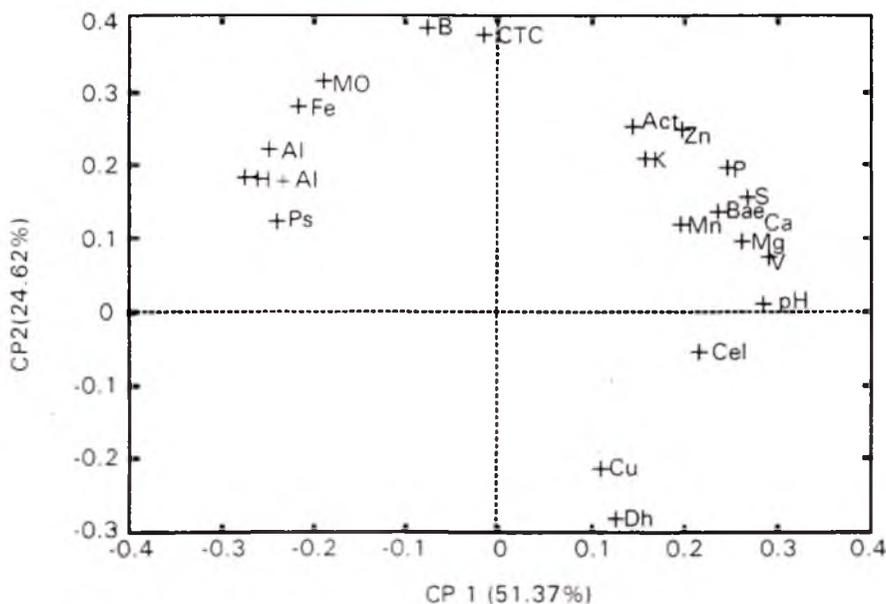


Figura 3C. Gráfico *biplot* para os dados de Suzano.

Como no estudo anterior, a PCA foi aplicada aos valores médios das 10 amostras de cada faixa. Para cada fazenda, partiu-se de matrizes  $5 \times 8$  (5 faixas  $\times$  8 variáveis), selecionando-se um modelo que, com duas CPs, explicou entre 85 e 91% da variância total (Macaúba: 87,37%; Lagoa do Fogão: 85,35%; Cuiabanos: 91,17%). A Figura 4 apresenta os gráficos *biplots* de CP1  $\times$  CP2 para as três fazendas: Macaúba (Fig. 4A), Lagoa do Fogão (Fig. 4B) e Cuiabanos (Fig. 4C).

Em todos os casos, o primeiro fator a ser modelado foi a separação da faixa de mata (valores negativos na CP1) das demais faixas (valores positivos na CP1). As faixas de mata caracterizaram-se por uma alta biomassa microbiana (BiM) e uma baixa composição de celulolíticos (Cel). A CP2 foi interpretada como sendo um fator de separação entre as faixas de sistema sustentável e convencional. Os parâmetros bioquímicos, polissacarídeos (Ps), desidrogenase (Dh) e biomassa microbiana (BiM), se correlacionaram positivamente com as faixas de tratamento sustentável, enquanto microrganismos celulolíticos e solubilizadores (Sol) correlacionam-se negativamente. A Fazenda Macaúba apresentou a melhor separação entre faixas de sistemas sustentáveis e convencionais. Em todos os casos, a CP3 (que explicava entre 6 e 11% da variância) foi descartada como sendo um fator de diferenciação entre faixas de mesmo tratamento.

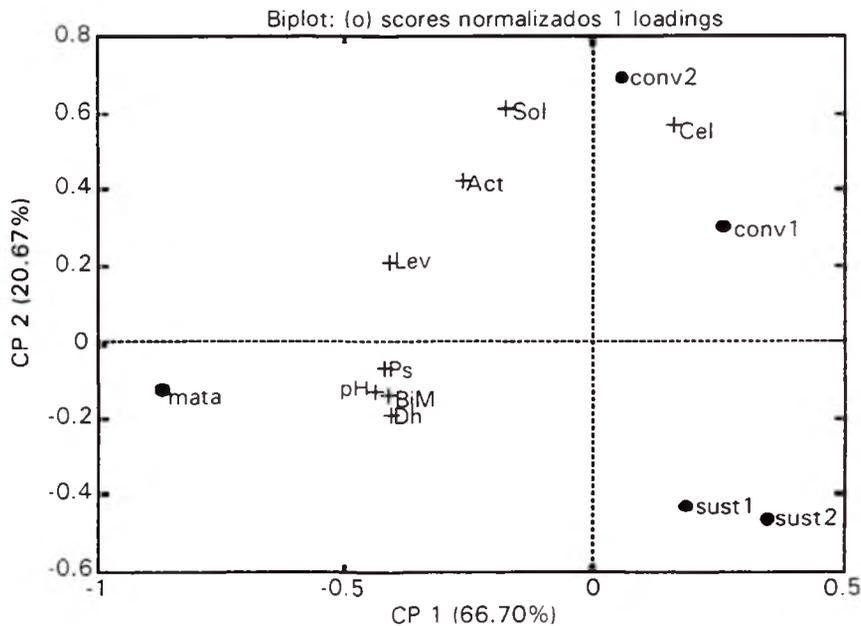


Figura 4A. Resultado da análise de componentes principais (PCA), mostrando os biplots das duas primeiras componentes principais para os dados de Guaira: Fazenda Macaúba.

A PCA permitiu, portanto, distinguir quais as variáveis ou fatores que mais influenciaram na separação entre amostras de solos submetidas a diferentes tipos de manejo.

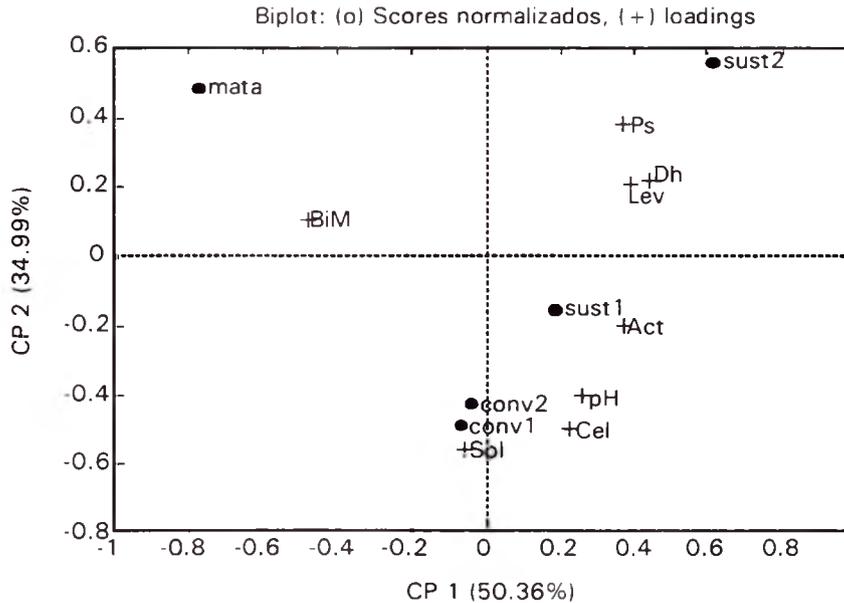


Figura 4B. Gráfico *biplot*: Fazenda Lagoa do Fogão.

## 2.2 Outras aplicações

Um exemplo importante encontrado na literatura é o trabalho de Stenberg et al. (1998), que aplicou PCA para avaliar a qualidade de solos cultivados. Neste trabalho, as variáveis químicas, físicas e biológicas foram medidas em dois grupos de amostras: no primeiro, 52 amostras de um mesmo campo (chamado Ekhaga) e no segundo, 26 amostras de diferentes solos abrangendo toda a Suécia. A aplicação da PCA possibilitou a identificação das principais tendências nos dados (de acordo com as PCs) e relacionou-as com três fatores: matéria orgânica, pH e atividade microbiana. Além disso, foi possível visualizar a separação das amostras em função da granulometria, do tipo de cultura do solo e de sua localização geográfica.

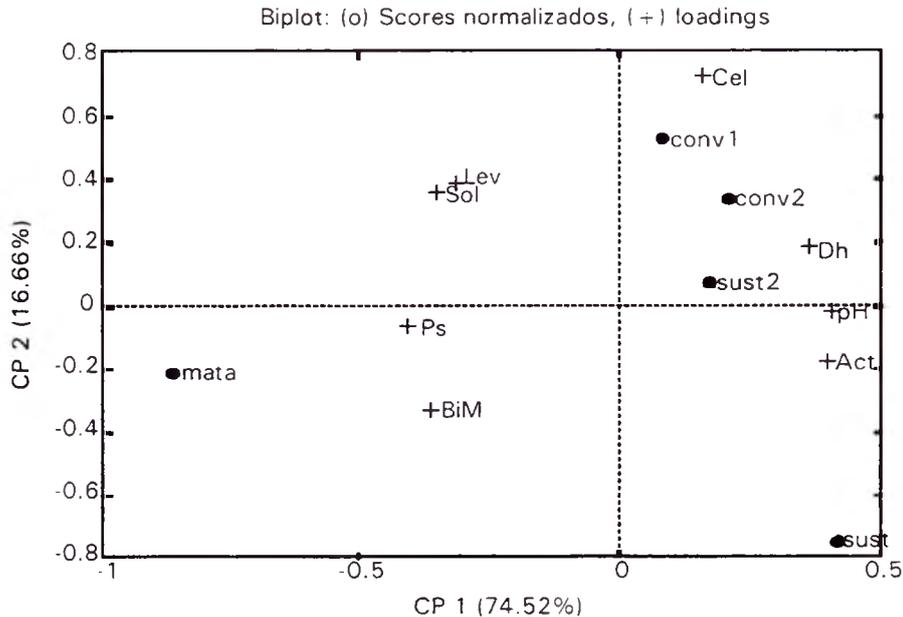


Figura 4C. Gráfico *biplot*: Fazenda Cuiabanos.

Muitos trabalhos recentes procuraram aplicar esse tipo de estratégia para avaliar a fertilidade do solo e comparar as condições de manejo. Estes estudos permitiram classificar solos de acordo com a sua fertilidade (Nolin et al., 1989), comparar nutrientes de plantas e solos (Németh et al., 1993) e determinar os fatores que controlam a mineralização de nitrogênio em solos úmidos (González-Prieto et al., 1992), a denitrificação em solos cultivados e não cultivados (Horwath et al., 1998) e a deterioração de solos semi-áridos pelo seu uso (Quiroga et al., 1998). Outra aplicação interessante foi o estudo dos parâmetros que controlam a atividade de microrganismos benéficos, para estabelecer um controle biológico (Duffy et al., 1997).

A utilização de modernas técnicas analíticas instrumentais pode gerar dados com grande potencial de informação, abrindo novos horizontes para as estratégias multivariadas. A Espectroscopia no Infravermelho (IV) é a técnica mais usada, principalmente na determinação de MO, sendo que o solo pode ser classificado de acordo com o seu teor de MO (Henderson et al.,

1989). Outra opção é o uso da combinação PCA/IV na seleção de amostras de solo que tenham grande variabilidade de propriedades, partindo-se de uma grande população (Stenberg et al., 1995).

Outro grande objetivo das estratégias multivariadas exploratórias é o estudo da contaminação de solos por metais pesados e outros poluentes. Os fatores (ou CPs) obtidos na PCA podem ser usados para caracterizar fontes poluentes de metais pesados. Uma boa ilustração desta aplicação é o artigo de Krieg & Einax (1994), que estudaram este tipo de contaminação em diferentes locais da Alemanha, próximos a indústrias.

A PCA, além de ser usada no estudo direto dos contaminantes no solo, pode ser útil na escolha das melhores condições para métodos de determinação. Kokot et al. (1992) compararam qual o melhor, dentre 18 extratores, para a digestão em forno de microondas de 5 metais determinados por Análise de Absorção Atômica (AAS). Pyle et al. (1996) estudaram qual a melhor, dentre as 4 técnicas analíticas instrumentais, para a determinação de chumbo e cádmio em 50 amostras de solo.

Steinheimer et al. (1994) correlacionaram as variáveis que influenciam na eficiência da extração por fluído supercrítico de pesticidas no solo. Almendros (1995) usou a Análise de Fatores por Correspondência para estudar as interações entre pesticidas e substâncias húmicas no solo e Helena et al. (2000) usaram a PCA no estudo da evolução temporal da composição de águas subterrâneas.

Finalizando, constata-se que métodos, como o estudo de correlações individuais entre variáveis, ainda são aplicados em sistemas como os aqui descritos, embora para isso eles se mostrem muito limitados. Existe portanto, a necessidade de uma maior interdisciplinaridade na abordagem das questões do solo e, para isso, os “quimiometristas” poderão desempenhar um papel importante junto aos pesquisadores de áreas correlatas da ciência ambiental.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMENDROS, G. Sorptive interactions of pesticides in soils treated with modified humic acids. **European Journal of Soil Science**, v.46, p.287-301, 1995.
- BRUNS, R. E.; FAIGLE, J. F. G. Quimiometria. **Química Nova**, v.8, p.84-99, 1985.
- DUFFY, B. K.; OWNLEY, B. H.; WELLER, D. M. Soil chemical and physical properties associated with supression of take-all of wheat by trichoderma koningii. **Phytopathology**, v.87, p.1118-1124, 1997.
- FORINA, M.; ARMANINO, C.; LANTERI, S.; LEARDI, R. Methods of varimax rotation in factor analysis with applications in clinical and food chemistry. **Journal of Chemometrics**, v.3, p.115-125, 1988.
- GELADI, P.; KOWALSKI, B. R. Partial least squares regression: a tutorial. **Analitica Chimica Acta**, v.185, p.1-17, 1986.
- GONZÁLEZ-PRIETO, S.J.; VILLAR, M. C.; CARBALLAS, M.; CARBALLAS, T. Nitrogen mineralization and its controlling factors in various kinds of humid-zone soils. **Plant and Soil**, v.144, p.31-44, 1992.
- HELENA, B.; PARDO, R.; VEGA, M.; BARRADO, E.; FERNANDEZ, J.M.; FERNANDEZ, L. Temporal evolution of groundwater composition in na alluvial aquifer (pisuerga river, spain) by principal component analysis. **Water Research**, v.34, p.807-816, 2000.
- HENDERSON, T. L.; SZILAGYI, A.; BAUMGARDNER, M. F.; CHEN, C. T.; LANDGREBE, D. A. spectral band selection for classification of soil organic matter content. **Soil Science Society of America Journal**, v.53, p.1778-1784, 1989.
- HORWATH, W. R.; ELLIOT, L. F.; STEINER, J. J.; DAVIS, J. H.; GRIFFITH, S. M. Denitrification in cultivated and noncultivated riparian areas of grass cropping systems. **Journal of Environmental Quality**, v.27, p.225-231, 1998.
- JÖRESKOG, K. G.; KLOVAN, J. E.; REYMENT, R. A. **Geological factor analysis**. Amsterdam: Elsevier Science, 1976.
- KOKOT, S.; KING, G.; KELLER, H. L.; MASSART, D. L. Microwave digestion: an analysis of procedures. **Analitica Chimica Acta**, v.259, p.267-279, 1992.
- KRIEG, M.; EINAX, J. Chemometric Characterization of Soil Depth Profiles. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v.348, p.490-495, 1994.
- MARTENS, H.; NAES, T. **Multivariate calibration**. New York: John Wiley & Sons, 1989. p.97-108.

- NÉMETH, T.; BORSZÉKI, J.; GEGUS, E. Correlation study of soil and plant nutritive elements by principal component analysis. **Canadian Journal of Applied Spectroscopy**, v.38, p.121-124, 1993.
- NOLIN, M. C.; WANG, C.; CAILLIER, M. J. Fertility grouping of montreal lowlands soil mapping units based on selected soil characteristics of the plow layer. **Canadian Journal of Soil Science**, v.69, p.525-541, 1989.
- PICCOLO, A. Humus and soil conservation. In: PICCOLO, A., ed. **Humic substances in terrestrial ecosystems**. Amsterdam: Elsevier Science, 1996. p.225-264.
- PYLE, S. M.; NOCERINO, J. M.; DEMING, S. N.; PALASOTA, J. A.; PALASOTA, J. M.; MILLER, E. L.; HILLMAN, D. C.; KUCHARIC, C. A.; COLE, W. H.; FITZPATRICK, P. M.; WATSON, M. A.; NICHOLS, K. D. Comparison of AAS, ICP-AES, PSA, and XRF in determining lead and cadmium in soil. **Environmental Science and Technology**, v.30, p.204-213, 1996.
- QUIROGA, A. R.; BUSCHIAZZO, D. E.; PEINEMANN, N. Management discriminant properties in semiarid soils. **Soil Science**, v.163, p.591-597, 1998.
- SENA, M. M.; POPPI, R. J.; FRIGHETTO, R. T. S.; VALARINI, P. J. Estudo quimiométrico do efeito de práticas de manejo do solo sobre parâmetros bioquímicos e biológicos em Guaíra/SP. In : CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 38., 1998, São Luís, MA. **Anais...** São Luiz: SBQ, 1998.
- SENA, M. M.; POPPI, R. J.; FRIGHETTO, R. T. S.; VALARINI, P. J. Aplicação da análise de componentes principais (PCA) no estudo do efeito de práticas de manejo de solos sobre parâmetros químicos e biológicos em Suzano/SP. In: REUNIÃO ANUAL DA SBQ, 22., 1999, Poços de Caldas, MG. **Anais...** Poços de Caldas, SBQ, 1999.
- SENA, M. M.; POPPI, R. J.; FRIGHETTO, R. T. S.; VALARINI, P. J. Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos. **Química Nova** (artigo aceito para publicação em setembro/1999).
- STEINHEIMER, T. R.; PFEIFFER, R. L.; SCOGGIN, K. D. Extraction of atrazine, cyanazine, desethylatrazine, desisopropylatrazine, and metolachlor from fortified western corn-belt soils by SFE with CO<sub>2</sub>. **Analytical Chemistry**, v.66, p.645-650, 1994.
- STENBERG, B.; NORDKVIST, E.; SALOMONSSON, L. Use of near infrared reflectance spectra of soils for objective selection of samples. **Soil Science**, v.159, p.109-114, 1995.
- STENBERG, B.; PELL, M.; TORSTENSSON, L. Integrated evaluation of variation in biological, chemical and physical soil properties. **Ambio**, v.27, p.9-15, 1998.
- TORSTENSSON, L.; PELL, M.; STENBERG, B. Need of a strategy for evaluation of arable soil quality. **Ambio**, v.27, p.4-8, 1998.

WISE, B. M.; GALLAGHER, N. B. **PLS Toolbox 2.0**. Manson: Eigenvektor Research, 1998. p.16-24.

ZAMPRONIO, C. G. Determinação simultânea de ácidos fracos, em análise por injeção em fluxo, empregando calibração multivariada não linear, por treinamento de redes neurais artificiais. Campinas: Universidade Estadual de Campinas-Departamento de Química Analítica, 1998. Dissertação de Mestrado. p.30-40.

# III. DETERMINAÇÃO DA UMIDADE, PH E CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE ÁGUA DO SOLO

Regina Teresa Rosim Monteiro  
Rosa Toyoko Shiraishi Frighetto

São três os parâmetros fundamentais associados ao funcionamento da cadeia biológica e bioquímica dos processos que ocorrem no solo, quais sejam a umidade, o pH e a capacidade de retenção de água.

## Determinação da umidade

### Procedimentos:

- Pesar aproximadamente 5g de solo úmido (passado por peneira de 2mm de malha) em recipiente de peso conhecido e em balança analítica;
- Levar à estufa por 24 horas a 105°C;
- Após esse período, deixar esfriar em dessecador e pesar o recipiente com o solo seco ;

- Calcular a umidade pela fórmula:

$$U = \frac{W2 - W3}{W3 - W1} \times 100\%$$

Onde:

W1 = peso do recipiente

W2 = peso do recipiente + solo

W3 = peso do recipiente + solo seco

A umidade será dada em porcentagem correspondente à massa de solo.

## **Derminação do pH:**

Medida do potencial, eletronicamente, por meio de eletrodo combinado imerso em suspensão solo:líquido, na proporção de 1:2,5.

- Pesar em béquer de 50mL, 10g de solo;
- Adicionar 25mL de água deionizada ;
- Deixar agitar por 15 a 20 minutos;
- Esperar decantar por cerca de 30 minutos ou mais;
- Medir o pH do sobrenadante, no mínimo por 2 minutos e anotar o valor.

## **Determinação da capacidade de retenção de água**

As avaliações microbiológicas são conduzidas após o ajuste do conteúdo da água a um valor constante para todos os solos ou, preferencialmente, à capacidade de retenção de água, ou à percentagem desse valor. Isso assegura condições semelhantes aos microrganismos quanto à disponibilidade de água, condição crucial para o seu crescimento e atividade metabólica.

**Material**

Funil de filtração  
Papel de filtro  
Frasco coletor

**Procedimento**

Pesar em balança analítica 20g de solo com umidade natural, em duplicata, colocar sobre o papel de filtro acondicionado no funil e montado sobre o frasco coletor previamente pesado. Adicionar, em pequenas porções, 100g de água destilada (pesada em uma balança analítica) e deixar por uma noite. Cobrir com papel alumínio ou filme de plástico, para evitar a evaporação. Após esse período, dar uma pequena batida na haste do funil para liberar as últimas gotas de água que ficam presas nela. Pesar novamente, numa balança analítica, o frasco coletor. As testemunhas, também em duplicata, são procedidas da mesma maneira, porém sem os solos.

**Cálculo**

% capacidade de retenção =  $[(100 - W_p) + W_i] / dwt \times 100$

onde

$W_p$  = peso da água percolada (g).

$W_i$  = conteúdo da água (g) existente inicialmente na amostra.

$Dwt$  = peso seco do solo (g).



## **IV. PROBLEMAS ENCONTRADOS NA AVALIAÇÃO DE MICRORGANISMOS DO SOLO**

Rosa Toyoko Shiraishi Frighetto  
René Peter Schneider

As determinações da biomassa microbiana e a atividade de microrganismos no solo apresentam um problema analítico complexo de avaliação. Vários estudos demonstraram que os métodos clássicos, como aqueles que envolvem o isolamento e subsequente cultivo de microrganismos, não são adequados para quantificar os microrganismos no solo. O método de contagem de microrganismos viáveis, em geral, subestima a comunidade microbiana, quando comparado à técnica de contagem direta (Olsen & Bakken, 1987; Casida, 1968; Faegri et al., 1977). O baixo número de microrganismos ativos nos meios de cultura ocorrem devido aos seguintes fatores:

- somente pequena parte dos microrganismos presentes no meio ambiente está em fase de crescimento;
- muitos organismos têm crescimento lento e sua detecção demandaria tempos de incubação de várias semanas, com o risco de as colônias

de crescimento lento serem encobertas por colônias de crescimento mais rápido;

- a grande diversidade metabólica dos microrganismos do meio ambiente dificulta sua replicação nos meios de cultura;

Métodos de contagem direta estão sujeitos, também, às dificuldades técnicas quando se trata de ecossistemas do solo (Jenkinson & Ladd, 1981).

Corantes fluorescentes específicos, como por exemplo, o diacetato de fluoresceína (Schnürer & Rosewall, 1982) ou cloreto de 5-ciano-2,3-ditoluil tetrazólio (CTC) (Rodriguez et al., 1992), foram empregados para se determinar células metabolicamente ativas nos solos. Células ativas podem, também, ser determinadas pela combinação de auto-radiografia e microscopia (Bååth, 1988; Ramsay, 1984). Entretanto, esta metodologia requer atividade enzimática na presença de substratos e está sujeita às limitações associadas com a densidade de organismos e a espessura do biofilme no campo da visão.

A existência dos problemas associados ao uso da contagem de organismos viáveis e microscopia para se estimar a biomassa microbiana no solo tem estimulado pesquisas no desenvolvimento de novos métodos. Um deles trata de estimar a biomassa microbiana medindo-se a concentração do componente bioquímico específico da célula microbiana. Componentes esses, geralmente, presentes em todas as células, como a análise de ácidos graxos fosfolipídicos (PLFA = Phospholipid fatty acid), podem ser utilizados para se estimar a biomassa bacteriana e fúngica do solo (Frostegård & Bååth, 1996) e os componentes que são restritos a subgrupos, como o ergosterol para fungos (Eash et al., 1996) e o lipopolissacarídeo para bactérias (Zelles & Bai, 1993), são utilizados para se definir a estrutura da comunidade. Os métodos bioquímicos não apresentam aqueles problemas associados ao método clássico que dependem do crescimento microbiano e, por conseqüência, não apresentam o problema inerente à seleção microbiana aos nutrientes e nem requerem a remoção das células presentes nas superfícies. Os métodos

bioquímicos são geralmente extrativos e estão muitas vezes sujeitos à variabilidade da eficiência de extração e rompimento (*lise*) das células.

Nota-se que nenhum dos métodos, por si só, é absoluto, havendo necessidade de realizar um conjunto de análises para se estimar a comunidade microbiana e a sua biomassa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BÅÅTH, E. Autoradiographic determination of metabolically active fungal hyphae in forest soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.20, p.123-125, 1988.
- CASIDA, L. E. Methods for the isolation and estimation of activity of soil bacteria. In: GRAY, T.R.G.; PARKINSON, D., ed. **The ecology of soil bacteria**. Liverpool: Liverpool University Press, 1968.
- EASH, N. S.; STAHL, P.D.; PARKIN, T.B.; KARLEN, D.L. A simplified method for extraction of ergosterol from soil. **Soil Science Society of America Journal**, v.60, p.468-471, 1996.
- FAEGRI, A.; LID TORSVIK, V.; GOKSOYR, J. Bacterial and fungal activities in soil: separation of bacteria and fungi by a rapid fractionation centrifugation technique. **Soil Biology and Biochemistry**, v.9, p.105-112, 1977.
- FROSTEGÅRD, A.; BÅÅTH, E. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. **Biology and Fertility of Soils**, v.22, p.59-65, 1996.
- JENKINSON, D. S.; LADD, J.N. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. In: PAUL, E. A.; LADD, J.N., ed. **Soil biochemistry**. New York: Marcel Dekker, 1981. v.5, p.415-471.
- OLSEN, R. A.; BAKKEN, L.R. Viability of soil bacteria: optimization of the plate-count technique. **Microbial Ecology**, v.13, p.59-74, 1987.
- RAMSAY, A. J. Extraction of bacteria from soil: efficiency of shaking or ultrasonication as indicated by direct counts and autoradiography. **Soil Biology and Biochemistry**, v.16, p.475-481, 1984.
- RODRIGUEZ, G. G.; PHIPPS, D.; ISHIGURO, K.; RIDGWAY, H. F. Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.1801-1808, 1992.
- SCHNÜRER, J.; ROSEWALL, T. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. **Applied and Environmental Microbiology**, v.43, p.1256-1261, 1982.

ZELLES, L.; BAI, Q.Y. Fractionation of fatty acids derived from soil lipids by solid phase extraction and their quantitative analysis by GC-MS. **Soil Biology and Biochemistry**, v.25, p.495-507, 1993.

# V. MÉTODOS BÁSICOS PARA CONTAGEM DE PATÓGENOS DO SOLO: MEIOS SELETIVOS PARA ISOLAMENTO, AVALIAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO

Pedro José Valarini

## Introdução

Os fitopatógenos do solo são fatores restritivos à maioria das culturas. Valarini et al. (1996 e 1997) observaram que a compactação do solo era proporcional à severidade das doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* (mofo branco), *Fusarium solani* e *Rhizoctonia solani* (podridões radiculares) e *Sclerotium rolfsii* (podridão do colo), principalmente em culturas de feijão e tomate. Para melhor compreender esta correlação, resalta-se a importância do estudo integrado dos parâmetros físico, químico, biológico e bioquímico do solo.

O isolamento e a contagem de microrganismos do solo nos proporcionam informação útil quanto ao efeito de fatores ambientais sobre a comunidade

microbiana do local em estudo, embora este método subestime a população microbiana viável. Entretanto, deve-se ter cautela na interpretação desses procedimentos, pois estes trazem pouca informação a respeito da importância ecológica dos microrganismos. O objetivo deste capítulo é oferecer uma introdução geral às técnicas laboratoriais de preparação de meios de cultura específicos, isolamento dos microrganismos e sua interpretação.

## Protocolo de análise

### 1. Método de avaliação

No caso específico do feijoeiro, a avaliação dos fitopatógenos de solo consiste em determinar a incidência (% de plantas atacadas) e a severidade das podridões radiculares (% de dano no sistema radicular) e de colo (*F. solani*, *R. solani* e *S. rolfsii*) no estágio de desenvolvimento de plântulas ( $\pm 20$  dias), tanto das amostras de plântulas coletadas diretamente no campo, como daquelas obtidas a partir do teste da planta indicadora em casa de vegetação. Esta avaliação poderá ser estendida para outras culturas anuais que apresentam ataque dos mesmos patógenos.

No caso da severidade da doença, utiliza-se escala de notas variando de 1 a 5, sendo 1 = sistema radicular sadio, 2 = sistema radicular fracamente atacado (1 a 10%), 3 = sistema radicular medianamente atacado (11 a 25%), 4 = sistema radicular bem atacado (26 a 50%) e 5 = sistema radicular fortemente atacado (51 a 100%).

Com relação a *S. sclerotiorum*, além da contagem de escleródios e teste de viabilidade em laboratório, o patógeno é avaliado no campo (incidência e severidade), nos estádios de florescimento e frutificação em feijão e tomate industrial.

O teste de patogenicidade dos isolados suspeitos de serem *Fusarium solani* e *Rhizoctonia solani* segue o seguinte procedimento:

- Inoculação dos isolados em solo esterilizado e semeadura de sementes sadias de feijão em casa-de-vegetação (teste da planta indicadora) e/ou técnica do pareamento de culturas puras dos isolados com sementes pré-germinadas como descrito a seguir:
- Pré-germinação das sementes em placas com papel de filtro umedecido, por 3 a 4 dias.
- Preparo de lâminas estéreis em placas com papel de filtro umedecido.
- Pareamento da semente pré-germinada e do isolado de fungo em lâmina (distância de  $\pm 1$  cm).

A avaliação consiste em verificar o escurecimento das radículas em contato com a estrutura do fungo, indicando ser patogênico ou não. Como controle, utiliza-se parear a semente pré-germinada com parte do meio sem o fungo.

## 2. Método de isolamento

Os patógenos que produzem estruturas de resistência (escleródios) no solo são avaliados utilizando-se o seguinte procedimento: amostras de 1kg de solo são passadas em água corrente através de peneiras de malhas 2,0; 0,85 e 0,36mm de diâmetro até que permaneça somente material maior que a malha das peneiras. Para se evitar perda de material, o solo é submergido em água dentro de uma bandeja. A seguir, com a ajuda de pinça, separam-se as estruturas dos fungos: *S. rolfsii* (pequenas,  $\leq 1$ mm, arredondadas, marrons e brilhantes) e *S. sclerotiorum* (maiores, de 2 a 5 mm, irregulares, negras e opacas) de partículas e outros materiais do solo que muitas vezes podem ser confundidos. A seguir, as estruturas do fungo são desinfestadas com hipoclorito de sódio comercial (1:3) por 3 minutos, plaqueadas em meio de cultura (BDA + estreptomicina) e incubadas em câmaras de crescimento a 25°C por um período de 2 a 3 dias para verificar a viabilidade e patogenicidade do fungo.

O procedimento para isolamento do *Fusarium* é o mesmo descrito para os grandes grupos de microrganismos, contudo utiliza-se o meio seletivo de Nash & Snyder (1962). Plaqueia-se a diluição  $10^{-2}$  na quantidade de 0,1mL por placa. Após o isolamento das colônias, deve-se proceder ao teste de patogenicidade das linhagens de *Fusarium* isoladas.

Os meios de cultura e soluções para estes testes são:

#### BDA + Estreptomicina (para *S. sclerotiorum* e *S. rolfsii*)

Batata ..... 200g  
Dextrose ..... 20g  
Ágar..... 20g  
Água destilada.....1000mL

Após a autoclavagem, adicionar 1g de estreptomicina (de maneira a formar solução 1000ppm (1g/litro)) dissolvida em água esterilizada. No caso específico de *S. sclerotiorum*, este deve sofrer um choque térmico de 24 horas em geladeira a  $\pm 5^{\circ}\text{C}$ .

#### Solução de Hipoclorito de sódio (1:3)

250mL de hipoclorito de sódio comercial  
750mL de água destilada

#### BDA + PCNB (meio semi-seletivo para *F. solani*)

(Pentacloronitrobenzeno)  
PCNB (75% PM) – 1g/L de meio

#### BDA + Benomil (meio semi-seletivo para *R. solani*)

Benomil (50% PM) – 1g/L de meio

**Meio Seletivo para *Fusarium* (Nash & Snyder, 1962)**

Peptona.....	15g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0,5g
Ágar .....	16g
Água destilada .....	1000mL

Após a autoclavagem, adicionar:

Estreptomicina .....	0,3g
PCNB .....	1,0g
Cloramfenicol .....	0,25g
Ácido Lático 85% .....	0,4mL

**Avaliação e cálculos**

A incidência de fitopatógenos é determinada pela contagem do número de plantas com sistema radicular afetado em relação ao sadio e é dada em percentagem, enquanto que a severidade da doença é avaliada por escala de notas que, no caso, foi tomada variando de 1 a 5 (Figura 1) sendo:

- 1 = sistema radicular sadio;
- 2 = sistema radicular levemente atacado (1 a 10%);
- 3 = sistema radicular medianamente atacado (11 a 25%);
- 4 = sistema radicular bem atacado (26 a 50%) e
- 5 = *sistema radicular fortemente atacado (51 a 100%).*

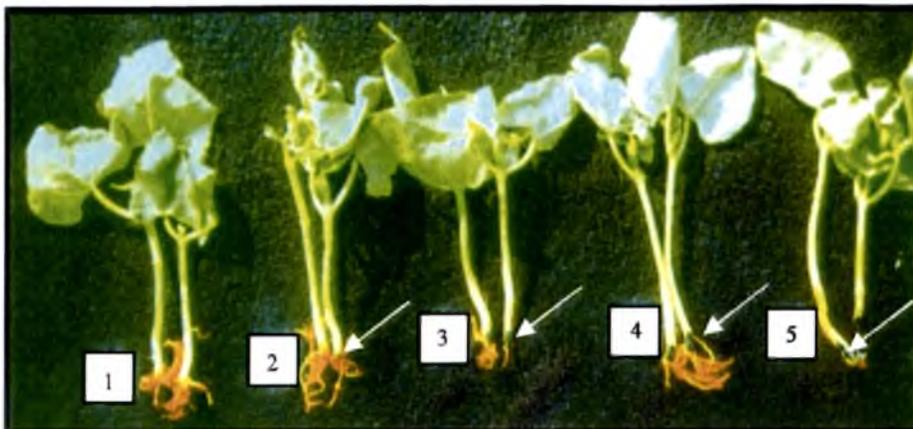


Figura 1. Escala de notas da incidência de fitopatógenos no sistema radicular.

Neste caso, a partir de 100 plantas avaliadas, constrói-se uma Tabela na qual, de um lado, consta a escala de notas (1 a 5) e, de outro, o número de plantas (repetições), somando-se as plantas doentes nas diferentes notas e se aplica a média ponderada para obter a severidade média final do tratamento.

Por exemplo: suponhamos que de 100 plântulas avaliadas, temos uma incidência de 90%, isto é, 90 plantas doentes em 100. Nessas 90 plantas doentes, a severidade foi de: 15 plantas com severidade 2, 25 plantas com severidade 3 e 50 plantas com severidade 4. Temos, então:

$$\text{Índice de Severidade Médio} = \frac{1 \times 10 + 15 \times 2 + 25 \times 3 + 50 \times 4}{100} = 3,15$$

Isto significa que o dano provocado pela doença no sistema radicular foi de 11 a 25%.

No caso da contagem de escleródios em amostras de solo (1 kg), é preciso calcular quantos escleródios há em 1m<sup>2</sup>. Assim, tem-se:

$$1\text{m}^2 = 100\text{cm} \times 100\text{cm} = 10000\text{cm}^2 \times \text{profundidade de } 3\text{cm} = 30000\text{cm}^3$$

Se a densidade do solo é  $0,90\text{g/cm}^3$  e se  $d = m/V$ , temos que:

$0,90 = m/30000\text{cm}^3$ , portanto  $m = 27\text{kg}$  de solo.

Se nas amostras de 1 kg de solo encontrou-se em média 0,10 escleródios/kg, logo em 27kg teremos 2,7 escleródios/m<sup>2</sup>.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRADLEY, R.S.; ASAKAWA, N.; LATORRACA, S.; MAGALHÃES, F.M.M.; OLIVEIRA, L.A.; PEREIRA, R.M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfato na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. *Acta Amazonica*, v.12, n.1, p.15-22, 1982.

LABEDA, D.P. *Isolation of biotechnological organisms from nature*. New York: McGraw-Hill, 1990. Cap.1. (The McGraw-Hill Environmental Biotechnological Series).

NASH, S.M.; SNYDER, W.C. Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean root Fusarium in field soils. *Phytopathology*, v.52, n.6, p.567-572, 1962.

TOKESHI, H. Manejo da microflora epífita no controle de doenças de plantas. In: BETTIOL, W., coord., REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE DOENÇAS DE PLANTAS, 4., 1991, Campinas, SP. *Anais...* Jaguariúna: EMBRAPA- CNPMA, 1991. p.32-62.

VALARINI, P.J.; FRIGHETTO, R.T.S.; TOKESHI, H.; OLIVEIRA, D.A. Action of effective microorganisms in soils of intensive agriculture in Brazil. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON KYUSEI NATURE FARMING, 5., 1997, Bangkok. *Proceedings...* Bangkok, 1997. Summary, p.15.

VALARINI, P.J.; SOUZA, M.D.; TOKESHI, H.; OLIVEIRA, D.A.; MORSOLETTO, R.V. Impacto ambiental de sistema intensivo de cultivo em agricultura irrigada sobre propriedades físico-química e microbiológica do solo. In: CONGRESSO NACIONAL DE IRRIGAÇÃO E DRENAGEM, 11., 1996, Campinas, SP. *Anais...* Campinas: UNICAMP, 1996. p.447-466.





# **VI. DETERMINAÇÃO DE ACTINOMICETOS, LEVEDURAS, BACTÉRIAS ESPORULANTES E SOLUBILIZADORES DE FOSFATO NO SOLO**

Pedro José Valarini

## **Introdução**

A diversidade biológica do solo forma a base de sustentação da atividade agrícola, visto que dela derivam a variedade de plantas cultivadas e invasoras, seus polinizadores e agentes de controle biológico de doenças e pragas e uma ampla gama de microrganismos que participam de processos biológicos e bioquímicos responsáveis pela formação e manutenção da estrutura física e da fertilidade do solo (Tokeshi, 1991; Altieri et al., 1996). Além disso, os microrganismos desempenham funções importantes de interação benéfica com a planta, tais como, fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato e micorrização.

Assim, as freqüentes aplicações de pesticidas para controle fitossanitário e o manejo inadequado das práticas agrícolas influenciam fortemente a microbiota benéfica do solo (Mäder et al., 1996). Conseqüentemente, os processos mais importantes controlados pelos organismos do solo são afetados.

## Protocolo de análise

### 1. Método de Isolamento

A partir da amostra de solo peneirado são tomadas 10g e adicionadas a 90mL de água destilada esterilizada ( $10^{-1}$ ), em frasco tampado. A seguir, agitar a 200rpm por 15 minutos e fazer diluições de 1mL de solução de solo para 9mL de água destilada esterilizada, até a concentração de  $10^{-3}$ . Fazem-se 2 tubos de diluição  $10^{-3}$ . Posteriormente, plaquear 0,1mL por placa (3 repetições) das diluições correspondentes a cada grupo de microrganismos:

Leveduras –  $10^{-2}$

Bactérias esporulantes\* –  $10^{-3}$

Actinomicetos\*\* -  $10^{-3}$

Celulolíticos –  $10^{-1}$

Solubilizadores –  $10^{-2}$

Obs.: \*Os tubos da diluição  $10^{-3}$  devem sofrer um choque térmico, em banho-maria a  $85^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos, antes de serem plaqueados para selecionar as bactérias esporulantes.

\*\*O outro conjunto de tubos da diluição  $10^{-3}$  deve sofrer um choque térmico, em banho-maria a  $50^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, antes de ser plaqueado para selecionar os actinomicetos.

Dando seqüência ao procedimento, espalhar o inóculo uniformemente pela placa com alça de Drigalski e incubar a 25°C, placas invertidas, e proceder à contagem das colônias após o período correspondente a cada grupo de microrganismos:

- Leveduras – 3 a 5 dias
- Bactérias Esporulantes – 24 a 48 horas
- Actinomicetos – 5 a 7 dias
- Celulolíticos – 10 a 15 dias
- Solubilizadores – 10 a 15 dias

No caso dos celulolíticos e dos solubilizadores, contam-se somente as colônias formadoras de halos transparentes ao redor de si.

Os meios de cultura para cada grupo de microrganismos são:

**Leveduras:**

YMA + C + T (extrato de levedura-extrato de malte agar + cloramfenicol + tetraciclina)

- Extrato de leveduras ..... 3,0g
- Extrato de malte ..... 3,0g
- Peptona ..... 5,0g
- Glicose .....10,0g
- Agar .....20,0g
- Água destilada .....1000mL

Após autoclavagem, adicionar: 100mg de cloramfenicol e 100mg de tetraciclina, dissolvidos em água destilada esterilizada.

**Bactérias Esporulantes:**

NA (Nutriente Agar)

- Agar-nutriente.....23,0g
- Água destilada.....1000mL

Não dispondo deste meio pronto, deve-se prepará-lo, utilizando os seguintes componentes:

Peptona .....	5,0g
Extrato de carne .....	3,0g
Agar bacteriológico .....	15,0g
Água destilada .....	1000mL

**Actinomicetos:**

**ACA (Amido – Caseína – Agar)**

Amido.....	10,0g
Caseína .....	0,3g
Nitrato de Potássio .....	2,0g
Cloreto de Sódio .....	2,0g
Fosfato de Potássio dibásico .....	2,0g
Sulfato de Magnésio .....	0,05g
Sulfato Ferroso .....	0,01g
Ágar .....	16,0g
Água destilada .....	1000mL

**Celulolíticos:**

**CAA (Celulose – Asparagina – Agar)**

Sulfato de Amônio .....	0,5g
L-asparagina .....	0,5g
Fosfato de Potássio Monobásico .....	1,0g
Cloreto de Potássio .....	0,5g
Sulfato de Magnésio .....	0,2g
Cloreto de Cálcio anidro .....	0,1g
Extrato de Levedura .....	0,5g
Celulose* .....	10,0g
Agar .....	20,0g
Água destilada .....	1000mL

\* *Celulose microcristalina Avicel® - Merck*

Após a autoclavagem, adicionar: 5 mL/L<sup>-1</sup> de solução de Triton X-100 a 10%.

**Solubilizadores:**

GES (Glicose – Extrato de solo – Sais inorgânicos)

Fosfato Tricálcico .....	15,0g
Glicose .....	10,0g
Extrato de solo* .....	100mL
Sulfato de Magnésio .....	0,2g
Cloreto de Cálcio anidro .....	0,02g
Cloreto de Sódio .....	0,1g
Nitrato de Potássio .....	0,1g
Solução de Micronutrientes** .....	2mL
Fe-EDTA*** .....	4mL
Ágar .....	16,0g
Água destilada .....	900mL
Volume Final =	1000mL

**\*Extrato de Solo:**

1 kg de solo de mata peneirado + 1 litro de água destilada

Autoclavar por 30 minutos

Filtrar, completar o volume do filtrado para 1000mL

Ajustar o pH para 7.2

**\*\* Solução de Micronutrientes:**

Molibdato de Cálcio .....	0,2g
Sulfato de Manganês .....	0,235g
Ácido Bórico .....	0,28g
Sulfato Cúprico .....	0,08g
Sulfato de Zinco .....	0,024g
Água destilada .....	200mL

**\*\*\*Fe-EDTA:**

Sulfato Ferroso .....	0,11g
EDTA .....	0,14g
Água destilada .....	100mL

Dissolver os ingredientes separadamente (50mL de água para cada um). Aquecer a solução de EDTA e misturar a solução de sulfato ferroso à quente. Esfriar e armazenar em geladeira.

**2. Avaliação e Cálculos**

- Leveduras: contam-se diretamente nas placas as colônias de leveduras presentes. Neste meio crescem também muitos fungos. Diferenciam-se as leveduras pelas características de suas colônias.
- Bactérias Esporulantes: no choque térmico a 85°C são eliminadas todas as bactérias na forma vegetativa. Portanto, as bactérias crescidas em NA, após este tratamento, são contadas.
- Actinomicetos: como o meio de Amido-Caseína-Agar é propício ao desenvolvimento de bactérias, procede-se o choque térmico a 50°C para eliminar uma parte delas. Porém, mesmo assim, crescem colônias de bactérias. É fácil, entretanto, diferenciar os actinomicetos pelas características de suas colônias que, neste meio contendo amido, são bem típicas: colônias compactas, sem brilho e cheiro característico de "terra".
- Celulolíticos: no meio CAA crescem tanto fungos como bactérias. A adição de Triton X-100 é para reduzir o tamanho das colônias de fungos para facilitar a visualização do halo de degradação da celulose. A avaliação deste grupo de microrganismos, geralmente fungos, considera somente as colônias que formam ao redor de si um halo transparente onde a celulose foi degradada, visto que esta, sendo insolúvel, torna o meio branco e opaco.

- **Solubilizadores:** A avaliação deste grupo de microrganismos considera somente as colônias que formam ao redor de si um halo transparente de solubilização do fosfato inorgânico adicionado ao meio de cultura, que é branco e opaco pela sua presença.

O número de microrganismos é expresso em ufc (unidades formadoras de colônias) por grama de solo. Para isso multiplica-se a média de 3 repetições do número de colônias por placa por 10, pois temos numa placa o número correspondente a 0,1mL. Assim, teremos o número de microrganismos por mL da diluição plaqueada. A seguir, multiplica-se pela diluição. Exemplo:

Média = 100 colônias (placas com 0,1mL da diluição  $10^{-3}$ )

Então:  $100 \times 10 = 1000 \text{ ufc/mL} \times 10^3 = 1 \times 10^6 \text{ ufc/g de solo}$

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTIERI, M.A.; MICHOLLS, C.I.; WOLFE, M.S. Biodiversity – a central concept of organic agriculture: restraining pest and disease. In: IFOAM. INTERNATIONAL SCIENTIFIC CONFERENCE, 1996, Copenhagen. **Proceedings...** Copenhagen: IFOAM, 1996. v.1, p.91-112.
- EGUCHI, S.Y.; CASTRO, M.M.S.; MECATE, G.M. **Manual de identificação de leveduras**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, 1991. 31p.
- MÄDER, P.; PFIFFNER, L.; FLIEBACH, A.; LÜTZOW, M.V.; MUNCH, J.C. Soil ecology-the impact of organic and conventional agriculture on soil biota and its significance for soil fertility. In: IFOAM. INTERNATIONAL SCIENTIFIC CONFERENCE, 1996, Copenhagen. **Proceedings...** Copenhagen: IFOAM, 1996. v.1, p. 24-46.
- TOKESHI, H. Manejo da microflora epífita no controle de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (coord.), REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE DOENÇAS DE PLANTAS, 4., 1991, Campinas, SP. **Anais...** Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1991. p.32-62.



# VII. AVALIAÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E SUA IMPORTÂNCIA AMBIENTAL

Adriana Parada Dias da Silveira

## Introdução

A micorriza é uma associação mutualística, na qual as raízes de plantas vasculares são invadidas por fungos específicos, ocorrendo perfeita integração morfológica e funcional entre os simbiosites. Trata-se de uma simbiose praticamente universal, não só pelo grande número de plantas susceptíveis à micorrização, como também por sua ocorrência generalizada. Os fungos formadores de micorriza são habitantes comuns do solo que, colonizando as raízes, estabelecem inter-relações biotróficas: a planta fornece substrato energético ao fungo, e este, através da rede de hifas externas, capta nutrientes da solução do solo e os transfere à planta hospedeira. Esta simbiose desempenha um papel importante no ambiente, contribuindo para evolução e sobrevivência das comunidades vegetais.

Entre os diferentes tipos de micorrizas, a arbuscular é a mais comum, estabelecendo-se, principalmente, nas culturas de importância econômica. Os fungos formadores desta micorriza, os chamados fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), pertencem à classe dos Zygomycetes, ordem Glomales, com seis gêneros, *Glomus*, *Sclerocystis*, *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Scutellospora* e *Gigaspora*, distribuídos em três famílias, *Gigasporaceae*, *Glomaceae* e *Acaulosporaceae*. Esses fungos possuem ampla distribuição, estando presentes em regiões tropicais, temperadas e árticas, tanto em florestas, áreas cultivadas, cerrado, como em dunas e desertos. Tratando-se de um simbiote obrigatório, necessita do hospedeiro para completar seu ciclo vital. Os esporos de resistência germinam no solo e emitem um micélio vegetativo que, encontrando a raiz de um hospedeiro suscetível, fixa-se a ela através de um apressório. Inicia-se, então, o processo de colonização da raiz pelo micélio, que se desenvolve inter e intracelularmente e se diferencia em duas estruturas: arbúsculos e vesículas. Ao mesmo tempo, o micélio externo cresce no solo, para além da rizosfera até que, em determinada fase de seu ciclo, o fungo esporula, liberando novos esporos (Silveira, 1992).

Os efeitos benéficos da associação têm despertado grande interesse e motivado a aplicação e/ou o manejo dos FMAs, como um fator de promoção do crescimento da planta, principalmente em condições de baixa fertilidade do solo. Os efeitos da micorriza arbuscular podem ser resumidos em:

- 1- Efeito no crescimento da planta: há estímulo do crescimento, principalmente em função do melhor estado nutricional da planta, com aumento na biomassa vegetal.
- 2- Efeito sobre a absorção de nutrientes: o micélio externo do fungo contribui para aumentar a absorção de nutrientes pouco móveis no solo, como fósforo, zinco e cobre. O fósforo é o mais importante nutriente envolvido na resposta de crescimento das plantas micorrizadas. A micorrização pode causar certa tolerância da planta a metais pesados.

- 3- Efeito na relação água-planta: as plantas micorrizadas são mais tolerantes ao estresse hídrico e usam a água absorvida mais eficientemente.
- 4- Efeito na fixação biológica do N<sub>2</sub>: leguminosas com dupla simbiose (rizóbio e FMA) apresentam maior nodulação, atividade da nitrogenase, concentração de leg-hemoglobina e teor de nitrogênio.
- 5- Efeito sobre fitopatógenos: pode atuar como agente de controle biológico de doenças.
- 6- Efeitos anatômicos e fisiológicos: a colonização da planta resulta em modificações anatômicas, histoquímicas, bioquímicas e fisiológicas.
- 7- Efeito na estrutura do solo: as hifas externas do fungo participam da agregação de partículas do solo e na estabilização de agregados.

Do ponto de vista ambiental, há possibilidade de utilização de tais fungos na recuperação de áreas erodidas ou degradadas, enquanto que, no aspecto agrícola, se restringe à inoculação comercial de culturas que passam por uma fase de viveiro. O manejo das culturas é o determinante do estabelecimento e do desempenho da simbiose. Existem vários fatores que interferem na infectividade do fungo e na eficiência da micorriza: 1- pH e nível de fertilidade do solo, principalmente quanto à disponibilidade de fósforo; 2- fatores físicos, como umidade/aeração, luminosidade e temperatura; 3- interações entre FMAs e outros organismos do solo; 4- aplicação de agrotóxicos; 5- manejo do solo e de culturas; 6- fatores inerentes à planta-hospedeira e ao fungo, como o grau de dependência da planta à micorrização e a compatibilidade fungo/planta.

# **Avaliação de FMAs e da micorriza**

A avaliação do estabelecimento e do desempenho da micorriza, bem como da ocorrência de FMAs, pode ser feita em vários aspectos, e diferentes variáveis podem ser determinadas, dependendo do objetivo do estudo.

## **A. Avaliação do desempenho da simbiose**

### **1. Crescimento da planta**

O desempenho de uma simbiose pode ser medido pelo crescimento da planta hospedeira, indicando o grau de eficiência do fungo, o grau de dependência da planta e o efeito de fatores diversos. O desenvolvimento da planta pode ser observado através da altura, produção de matéria seca, área foliar, produção de vagens e grãos etc.

### **2. Absorção de nutrientes**

A determinação do teor e conteúdo de nutrientes no tecido vegetal (folhas, parte aérea, raiz, grãos) pode ser indicativo da eficiência do fungo ou da planta micorrizada em absorver e acumular nutrientes, principalmente os de baixa mobilidade no solo, como o fósforo, zinco e cobre. Ensaios de cinética de absorção de nutriente, através dos quais se determinam os parâmetros cinéticos ( $V_{max}$ ,  $K_m$  e  $C_{min}$ ), permitem estimar o influxo líquido do nutriente e estudar os possíveis mecanismos envolvidos na absorção do nutriente pela hifa e/ou pela raiz micorrizada (Silveira, 1990).

### **3. Atividade enzimática e compostos específicos**

Atividade enzimática tem sido empregada como um instrumento de caracterização de espécies de FMAs (isoenzimas), no esclarecimento dos mecanismos envolvidos no metabolismo de fosfato e de outros nutrientes na

planta micorrizada, como marcador bioquímico nos estudos de reconhecimento fungo-hospedeiro, na quantificação de micélio ativo e na análise das interações entre os simbioses (Gianinazzi et al., 1992; Dumas-Gaudot et al., 1996). Em função do objetivo proposto analisa-se, de forma qualitativa e/ou quantitativa, diferentes enzimas, tais como fosfatases ácida e alcalina, quitinase, glucanase, peroxidase, catalase, ATPase e outras.

Vários compostos podem ser quantificados e extrádos da planta hospedeira para estudar os mecanismos bioquímicos e fisiológicos envolvidos na simbiose, tais como fitohormônios, amido, aminoácidos, ácidos graxos, etc.

## **B. Avaliação do estabelecimento da simbiose e da ocorrência de FMAs**

No estudo das micorrizas arbusculares e dos FMAs, a colonização radicular e a esporulação são variáveis que, obrigatoriamente, devem ser determinadas, existindo, para isto, alguns métodos básicos e outros mais avançados. Os métodos básicos mais comumente utilizados constam da revisão detalhada de Colozzi-Filho & Balota (1994) e aqui serão somente comentados e resumidos.

Na avaliação da ocorrência de FMAs e da micorriza, o primeiro passo para se garantir um trabalho de qualidade e resultados confiáveis é realizar uma amostragem criteriosa do solo e da raiz, principalmente em condições de campo, onde se espera maior diversidade de populações de FMAs. Alguns aspectos são particularmente importantes e devem ser observados: 1- número adequado de repetições, o que determina o número de amostras e subamostras a serem obtidas; 2- profundidade das amostragens determinada pela morfologia do sistema radicular; 3- época e periodicidade das amostragens. A coleta é geralmente feita na profundidade onde se concentra maior crescimento de raízes, que devem ser finas. O volume de solo amostrado, em quantidade suficiente para garantir adequada quantificação do número de esporos, deve ser acondicionado em saco plástico e mantido sob

refrigeração (4°C). As raízes são lavadas e armazenadas em frascos de vidro contendo álcool etílico 50% ou solução de AFA (5mL de ácido acético + 13mL de formol + 200mL de álcool etílico 50%).

## 1. Colonização radicular e quantificação do micélio interno

Os métodos básicos (histológicos) de avaliação da colonização são baseados na observação das estruturas fúngicas: vesículas, arbúsculos e hifas presentes no interior da raiz. O método clássico de clareamento e coloração de raízes foi descrito por Phillips & Hayman (1970): faz-se o clareamento a quente com KOH, seguido da acidificação com HCl diluído e coloração com o azul de tripano. O KOH remove o citoplasma e o núcleo da célula vegetal e a raiz fica clara e transparente, somente com o cilindro central visível, permitindo a coloração das estruturas fúngicas. A acidificação é feita para permitir melhor ação do corante. O tempo de exposição em cada fase da coloração depende do tipo e do estágio fisiológico da raiz e deve ser adequado de forma a não causar danos ou mesmo destruição do sistema radicular. A raiz corada é mantida em lactoglicerol para remoção do excesso do corante. Vários corantes podem ser usados: azul de tripano, azul de algodão, fucsina ácida, azul de metileno e outros. Para a determinação da colonização, muitas vezes há necessidade de se prepararem lâminas temporárias com lactoglicerol ou permanentes com PVA (resina de álcool polivinílico).

O método de determinação da colonização acusa ou quantifica as estruturas fúngicas: **arbúsculos** - ramificações dicotômicas do micélio interno; **vesículas** - glóbulos esféricos intra e intercelulares; **micélio** - hifas que se desenvolvem inter e intracelularmente e **esporos** - estruturas de resistência que podem em algumas espécies se formar dentro da raiz. A avaliação determina a porcentagem de colonização radicular ou a intensidade de colonização. Vários métodos podem ser empregados:

- **Método visual:** As raízes coradas são espalhadas uniformemente em uma placa e avaliadas por microscopia, atribuindo-se notas. O método

é subjetivo e depende dos critérios adotados pelo observador.

- **Método da lâmina:** Dez segmentos de raiz de 1 cm são selecionados ao acaso da raiz corada e dispostos paralelamente em uma lâmina de microscopia. São montadas de 4 a 10 lâminas por amostra e determina-se a porcentagem de colonização microscopicamente, adotando-se critérios aleatórios em função da extensão da colonização apresentada pela raiz. Este método também é subjetivo e geralmente usado para raízes grossas.
- **Método da placa quadriculada:** As raízes coradas são picadas e espalhadas uniformemente em uma placa de Petri, que possui, no fundo, linhas quadriculadas de 1,27cm. Em cada ponto de interseção da raiz com a linha conta-se a presença ou ausência de estruturas fúngicas, avaliando-se toda a extensão da placa ou no mínimo 100 pontos. Determina-se a porcentagem do comprimento de raízes colonizadas. O método é baseado na fórmula de Newman (1966), segundo a qual o comprimento total de raízes espalhadas numa dada área é igual ao número de vezes que elas interceptam uma linha reta traçada nesta área:

$$R = \frac{\pi A X n}{2H}$$

onde: R = comprimento total de raízes; A = área onde as raízes estão espalhadas; n = número de interseções e H = comprimento total das linhas retas. Quando a distância entre as interseções é 1,27cm, A = 2H, e o comprimento das raízes é igual ao número de interseções raiz-linha, R = n.

Este método não é subjetivo, resulta em menor erro, sendo, portanto, o mais empregado, principalmente para determinação de colonização em raízes mais finas, pois pode ser realizado sob microscópio estereoscópico.

## **2. Quantificação do micélio externo e interno**

O desenvolvimento do micélio é um fator importante na determinação da capacidade do fungo em aumentar a absorção de nutrientes e, portanto, o crescimento da planta. Entretanto, o comprimento de micélio extraradicular (micélio externo) e sua distribuição no solo são difíceis de serem avaliados (Sylvia, 1992).

**Os métodos indiretos de quantificação do micélio externo são:**

- colonização de plantas receptoras: estima-se a distância que as hifas do fungo percorrem no solo, entre uma planta doadora inoculada e plantas receptoras, mantidas separadamente, em recipientes com divisão (Xiao-Lin et al., 1991).
- solo agregado às raízes de planta micorrizada: pesa-se o solo aderido às raízes de plantas micorrizadas. Não é um método puramente quantitativo, mas pode ser utilizado em comparações relativas de desenvolvimento micelial entre diferentes FMAs (Sutton & Sheppard, 1976).
- determinação de quitina no substrato: o método é usado para quantificação da biomassa fúngica total, extra ou intra-radicular, através da determinação colorimétrica da quitina presente no substrato (Hepper, 1977; Frey et. al, 1994). Baseia-se na determinação da quitina da parede celular dos FMAs. O conteúdo de quitina no solo aumenta com o crescimento micelial e, após certo período de tempo, declina lentamente devido à queda no desenvolvimento do fungo (aumento na produção de estruturas de reserva, como as vesículas), autólices de hifas senescentes e decomposição do micélio morto. Apesar de não ser um método subjetivo (não exige experiência do operador), não exigir equipamento sofisticado e haver correlação significativa com o método histológico de determinação da colonização radicular, até cerca de 60% de colonização, este método possui algumas desvantagens: presença de substâncias interferentes no solo

(como aminoaçúcares), não distingüe micélio vivo de morto, não distingüe micélio de FMAs de outros fungos saprófitas, varia com a idade e condição da cultura (umidade, temperatura etc.), não há distinção entre a biomassa fúngica e a da microfauna (exoesqueleto de microartrópodes), não considera a presença de patógenos e de ovos de insetos.

#### **Os métodos diretos de quantificação são:**

- método de extração e contagem em membrana de filtração: a amostra de solo peneirada é suspensa em um determinado volume de água, colorida com corante específico, filtrada a vácuo em membrana de filtração quadriculada e quantificada em microscópio (Sylvia, 1988). Os corantes empregados são o azul de tripano ou o iodonitrotetrazólio – INT, ou pode ser empregada a auto-fluorescência natural ou induzida com diacetato de fluoresceína- FDA. A desvantagem é a não distinção entre fungos não micorrízicos e os FMAs. Outros métodos de extração como soluções de sacarose, centrifugações e extrator elétrico podem ser usados para limpeza do micélio (Vilariño et al., 1993). A quantificação de micélio ativo é feita com o emprego de compostos de tetrazólio, que diferenciam micélio ativo de inativo, tanto no solo como em raízes. Outro corante é o diacetato de fluoresceína- FDA, indicador de esterases (hidrólise de ésteres de ácidos graxos), que se torna fluorescente quando excitado com luz ultravioleta (Hamel et al., 1990). A utilização de FDA associado ao brometo de etídio permite a visualização tanto de estruturas vivas dormentes quanto de células em crescimento ativo.
- método de auto-fluorescência: pode ser usado para quantificação de colonização radicular, mas não para avaliação do micélio total ou ativo, pois este não apresenta autofluorescência, a qual se limitaria apenas aos arbúsculos. Para as demais estruturas (hifas, esporos e vesículas) a emissão de fluorescência é indicativo de inatividade, devido ao acúmulo de metabólitos fenólicos secundários.

- imunofluorescência: usada na quantificação e identificação de micélio extra-radicular (Wilson et al., 1993). Devido à produção de anticorpos específicos, distinguem-se espécies de FMAs. A técnica é difícil, pois exige um material fúngico puro para ser usado como antígeno, o que é complicado pela impossibilidade do cultivo axênico do FMA.

### **3. Avaliação e recuperação de esporos**

O número de esporos é indicativo do potencial de inóculo do solo e fornece o nível populacional de FMAs, o que, entretanto, não está necessariamente relacionado com o seu grau de infectividade. Vários métodos podem ser usados para avaliação e recuperação de propágulos (esporos e hifa) de FMA. Alguns avaliam a população de fungos de um modo geral, como o NMP (número mais provável) que, além de permitir a contagem, informa sobre o grau de infectividade das populações presentes no solo, e o método da placa, que é rápido e pode ser empregado para avaliações em vasos de multiplicação. Outros métodos são mais adequados para recuperação de esporos do solo, tais como: decantação e peneiramento úmido, centrifugação e flutuação em sacarose, centrifugação e flutuação em gradiente de sacarose, flutuação e adesão, centrifugação diferencial água/sacarose, sedimentação diferencial em coluna de gelatina e separação seca dos propágulos (Colozzi-Filho & Balota, 1994).

### **C- Técnicas moleculares e imunológicas**

Para investigar e avaliar a extensão da diversidade biológica nas comunidades de fungo micorrízico, a identificação do micélio é muito importante. Embora a caracterização morfológica seja a base da sistemática fúngica, alguns critérios usados em taxonomia não são encontrados facilmente, como por exemplo, a ausência de algumas estruturas do fungo quando associado à raiz ou durante a fase de crescimento vegetativo. Assim,

quando as características morfológicas são insuficientes, a análise do DNA é uma alternativa para investigar as relações genéticas entre os organismos e uma possibilidade de selecionar técnicas e regiões específicas para facilitar a identificação de populações e de indivíduos (Simon et al., 1992). O uso de técnicas moleculares no estudo das micorrizas recebeu significativo impulso com o PCR (*polimerase chain reaction*), porque requer uma quantidade mínima de DNA e permite amplificar DNA fúngico pelo uso de *primers* específicos, em raízes micorrizadas. Ainda permite construir árvore filogenética de espécies de FMA, o que seria impossível através de técnicas convencionais, devido a inabilidade destes fungos em crescer em cultura pura (Piché et al., 1994). Assim, as técnicas moleculares são usadas como complementares à morfologia, com o objetivo de identificar os fungos e investigar sua variabilidade genética. O uso de PCR-RFLP discrimina o DNA característico de uma determinada espécie fúngica. A análise de PCR-RAPD mostra o grau de polimorfismo inter- e intra-específico, pois permite gerar pares de *primer* espécie-específicos que podem ser usados para identificação, o que está sendo amplamente usado nos estudos de ecologia, para investigar populações nativas. A grande vantagem do RAPD é não requerer um conhecimento prévio do genoma em estudo, mas há necessidade de cultura axênica, pois o mesmo *primer* pode reconhecer regiões complementares em qualquer genoma. Resumindo, as técnicas usando PCR permitem: fazer o sequenciamento e o mapa de restrição do DNA de espécies de FMAs; obter probes moleculares específicos para identificação do fungo em cultura pura (na fase de esporo) ou em associação com o hospedeiro; estudar o grau de polimorfismo genético de uma determinada espécie.

Ensaio imunológico podem ser aplicados para distinguir isolados de uma mesma espécie de FMA, pela identificação de proteínas e glicoproteínas específicas (Wright et al., 1987).

Padrões eletroforéticos de isoenzimas também são empregados nos estudos taxonômicos de espécies de FMAs, empregando esporos (Sen & Hepper, 1986). Análise de ácidos graxos em esporos de diferentes espécies de FMA tem sido

empregada como ferramenta nos estudos de taxonomia e evolução de tais fungos (Morton & Bentivenga, 1994).

## **Protocolo de análise**

Os seguintes métodos foram empregados no preparo das amostras de raiz e de solo para demonstração prática:

### **1. Avaliação da colonização radicular**

O método clássico de coloração e clareamento de raízes foi descrito por Phillips & Hayman (1970) e consta do seguinte: 1g de raiz é lavado abundantemente com água corrente para remoção do álcool 50% e submerso em KOH a 10% para o clareamento, a 90°C; em seguida é lavada com água corrente e acidificada com HCl diluído (geralmente 1%) durante a noite, para ser, então, colorida com azul de tripano a 0,05%, a quente. Após a coloração, lava-se a raiz corada com água corrente e acondiciona-se em vidro com lactoglicerol, para remoção do excesso de corante. O tempo de exposição, em cada fase da coloração, depende do tipo e do estágio fisiológico da raiz e deve ser adequado de forma a não causar danos ou mesmo destruição do sistema radicular.

O método de determinação da colonização empregado é o da placa quadriculada: a raiz corada é picada e espalhada homogeneamente na placa, contam-se os pontos de interseção raiz x linha sob microscópio estereoscópico, anotando-se os positivos (presença de estrutura fúngica) e os negativos (ausência de estrutura), para cálculo da porcentagem do comprimento de raiz colonizada.

## 2. Contagem de esporos de FMA

O método empregado é de peneiramento úmido (Gerdemann & Nicolson, 1963), seguido de centrifugação e flutuação em sacarose (Jenkins, 1964). A amostra de solo (50mL) é suspensa em 1 a 2L de água e agitada vigorosamente para permitir a suspensão das partículas e a desagregação dos agregados maiores de solo, em seguida, é feita a decantação por alguns segundos, para que as partículas maiores que os esporos possam sedimentar. O sobrenadante é passado através de peneiras com aberturas de 710, 250, 105 e 45mm, uma de cada vez, começando pela de maior malha. O filtrado é recolhido em um béquer e homogeneizado antes de passar pela próxima peneira. Os esporos ficam retidos nas peneiras de acordo com o seu tamanho.

Para facilitar a contagem e separação dos esporos, associa-se o método da centrifugação em sacarose, para eliminar partículas de solo e material orgânico. O material retido na peneira é transferido para tubo de centrífuga de 50mL, adicionando-se água, e centrifugando por 4-5 minutos a 1750rpm. Em seguida, o sobrenadante é cuidadosamente descartado e adiciona-se solução de sacarose 50% (açúcar comum). O sobrenadante contendo os esporos é vertido na peneira de menor malha, lavado com água e recolhido em béquer, e a contagem é feita em placa com anéis concêntricos, sob microscópio estereoscópico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COLOZZI-FILHO, A.; BALOTA, E.L. Micorrizas arbusculares. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S., ed. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa, 1994. p.383- 418.
- DUMAS-GAUDOT, E.; SLEZACK, S.; DASSI, B.; POZO, M.J.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S. Plant hydrolytic enzymes (chitinases and B- 1,3-glucanases) in root reactions to pathogenic and symbiotic microorganisms. **Plant and Soil**, v.185, p.211-221, 1996.

- FREY, B.; VILARIÑO, A.; SCHÜEPP, H.; ARINES, J. Chitin and ergosterol content of extraradical and intraradical mycelium of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.26, n.6, p.711-717, 1994.
- GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, v.46, p.235-244, 1963.
- GIANINAZZI, S.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; TISSERANT, B.; LEMOINE, M.C. Protein activities as potential markers of functional endomycorrhizas in plants. In: READ, D.J.; LEWIS, D.H.; FITTER, A.H.; ALEXANDER, I.J., ed. **Mycorrhizae in ecosystems**. Cambridge: CAB International, 1992. p.333-339.
- JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Research**, v.48, p.692, 1964.
- HAMEL, C.; FYLES, H.; SMITH, D.L. Measurement of development of endomycorrhizal mycelium using three different vital stains. **New Phytologist**, v.115, p.297-302, 1990.
- HEPPER, C.M. A colorimetric method for estimating vesicular-arbuscular mycorrhiza infection in roots. **Soil Biology and Biochemistry**, v.9, p.15-18, 1977.
- MORTON, J.B.; BENTIVENGA, S.P. Levels of diversity in endomycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes) and their role in defining taxonomic and non-taxonomic groups. **Plant and Soil**, v.59, n.1, p.47-59, 1994.
- NEWMAN, E.I. A method for estimating the total length of root in a sample. **Journal of Applied Ecology**, v.3, p.139-141, 1966.
- PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, D.S. Improved procedure for clearing root and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, v.55, p.158-161, 1970.
- PICHÉ, Y.; SIMON, L.; SÉGUIN, A. Genetic manipulation in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, v.159, p.171-178, 1994.
- SEN, R.; HEPPER, C.M. Characterization of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus* spp.) by selective enzyme staining following polyacrylamide gel electrophoresis. **Soil Biology and Biochemistry**, v.18, p.29-34, 1986.
- SILVEIRA, A.P.D. Micorrizas. In: CARDOSO, E.J.B.N; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P., ed. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p.257-282.
- SIMON, L.; LALONDE, M.; BRUNS, T.D. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.291-295, 1992.

- SUTTON, J.C.; SHEPPARD, B.R. Aggregation of sand-dune soil by endomycorrhizal fungi. **Canadian Journal of Botany**, v.54, p.326-333, 1976.
- SYLVIA, D.M. Activity of external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Biology & Biochemistry**, v.20, n.1, p.39-43, 1988.
- SYLVIA, D.M. Quantification of external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Methods in Microbiology**, v.24, p.54-65, 1992.
- VILARIÑO, A.; ARINES, J.; SCHÜEPP, H. Extraction of vesicular-arbuscular mycorrhizal mycelium from sand samples. **Soil Biology and Biochemistry**, v.25, n.1, p.99-100, 1993.
- WRIGHT, S.F.; MORTON, J.B.; SWOROBUK, J.E. Identification of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by using monoclonal antibodies in a enzyme-linked immunosorbent assay. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, p.2222-2225, 1987.
- XIAO-LIN, L.; GEORGE, E.; MARSCHNER, H. Extension of the phosphorus depletion zone in VA-mycorrhizal white clover in a calcareous soil. **Plant and Soil**, v.136, p.41-48, 1991.
- WILSON, J.M.; TRINICK, M.J.; PARKER, C.A. The identification of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi using immunofluorescence. **Soil Biology and Biochemistry**, v.15, n.4, p.439-445, 1983.



# VIII. METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DE FIXADORES SIMBIÓTICOS DE NITROGÊNIO DO SOLO

Maria José Valarini

## Introdução

Embora o gás nitrogênio ( $N_2$ ) seja o principal constituinte da atmosfera, relativamente poucos organismos podem utilizá-lo para seu crescimento. Na biota terrestre, apenas microrganismos procariotos (bactérias e cianobactérias) apresentam a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico. Muitas bactérias fixadoras de  $N_2$  formam associações simbióticas com plantas, especialmente leguminosas, através do desenvolvimento da estrutura do nódulo. Apesar da taxonomia das bactérias formadoras de nódulos estar em constante mudança, a família *Rhizobiaceae* inclui 4 gêneros denominados *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* e *Sinorhizobium*, aqui referidos como rizóbios.

Uma importante consideração para otimização da fixação de  $N_2$  pela simbiose rizóbio-leguminosa está na resposta do microssimbionte e do nódulo

ao ambiente dinâmico do solo. O conhecimento da ecologia rizobiana é importante, inclusive, para aplicação e aceitação das tecnologias de inoculantes para melhoramento e sustentabilidade de ecossistemas agrícolas.

## Ecologia do rizóbio

Na ausência do hospedeiro vegetal, os rizóbios são considerados, ordinariamente, como bactérias do solo, com alguma vantagem genética ou ecológica perceptível apenas na presença da referida planta. Como bactérias livres da microflora do solo, os rizóbios estão sujeitos às condições físico-químicas e biológicas predominantes, sendo pressionados a competir com outros organismos por recursos limitados (Keyser et al., 1993).

Quando no estado de vida livre, o rizóbio estaria em sua fase saprofítica (Pena-Cabriales & Alexander, 1983; Lawson et al., 1987; Woomer et al., 1988). A leguminosa hospedeira atua, através do efeito da rizosfera, modificando a influência das características físico-químicas na distribuição e tamanho da população do rizóbio saprofítico. Os ambientes críticos para os rizóbios são as terras marginais com baixa pluviosidade, temperaturas altas, solos ácidos e pobres e de baixa capacidade de retenção de água (Bottomley, 1991). Por outro lado, fatores abióticos específicos, tais como, matéria orgânica ou conteúdo de argila, pH, saturação em bases etc. apresentam maior influência sobre a fase saprofítica do rizóbio quando exibem efeito interativo. Distribuição espacial e efeitos do micro habitat são, também, importantes. Introdução de rizóbios, através da inoculação em solos não estéreis, resulta em rápido declínio da população introduzida (Pena-Cabriales & Alexander, 1983). A relação entre ambiente e população de rizóbios nativos varia bastante. A presença de um particular *Rhizobium* ou *Bradyrhizobium* sp. está correlacionada com a ocorrência de seu hospedeiro apropriado. Número total de rizóbios foram significativamente correlacionados com precipitação média anual, cobertura de leguminosas e biomassa, temperatura

do solo, bases disponíveis, retenção de fósforo e tipo de solo (Woomer et al., 1988).

Quando presente junto à raiz de um hospedeiro receptivo, os rizóbios conseguem uma vantagem devido à capacidade de infectar e alcançar o interior da raiz (fase infectiva). O processo de infecção é, provavelmente, a fase mais sensível do ciclo de vida do rizóbio em estresses do meio ambiente. A leguminosa hospedeira exerce, também, substancial influencia sobre os eventos iniciais da infecção (Hirsch, 1992). O desenvolvimento quantitativo dos nódulos tem, também, fortes implicações na competição entre estirpes por ocupação do nódulo. Os dois *partners* simbióticos interagem no âmbito da expressão gênica através de sinais transmitidos reciprocamente por ativação de genes simbióticos nos estágios iniciais da infecção (Carlson et al., 1994).

Apesar do *Rhizobium* apresentar competência saprofítica como organismo da rizosfera, sua densidade populacional é bastante responsiva à presença da leguminosa hospedeira (Woomer et al., 1988; Kucey, 1989). Tal observação sugere que a denominada fase simbiótica é crítica ao estabelecimento de uma substancial população saprofítica dos rizóbios no solo. Por outro lado, o estabelecimento dos rizóbios no estágio simbiótico resulta da competição por sítios de nodulação entre estirpes durante o estágio de infecção. Um dos principais problemas na tecnologia da inoculação está no estabelecimento de estirpes introduzidas para nodulação de leguminosas em solos contendo outras populações de rizóbios nativos. Inoculação prévia e cultivo continuado de uma leguminosa conferem considerável vantagem em número e adaptação ambiental à população nativa em competição com a estirpe introduzida pelo inoculante. O sucesso competitivo do *Rhizobium* inoculado está ligado à especificidade e à densidade de células no solo (Hardarson et al., 1989). Fatores genéticos importantes foram identificados para ambos os parceiros simbióticos, tais como amplitude hospedeira, mobilidade do rizóbio e produção de bacteriocina (Cregan et al., 1989; Catlow et al., 1990; Triplett, 1990).

## Detecção do rizóbio do solo

A quantidade de rizóbios do solo, dificilmente, pode ser conhecida, com algum grau de confiança, por plaqueamento direto e tampouco se conhece um meio seletivo apropriado para contagem de rizóbios em material contaminado. A maneira mais prática (porém trabalhosa) de demonstrar a presença de rizóbios no solo é através da semeadura de sementes superficialmente esterilizadas de leguminosas no solo e procurar por nódulos em suas raízes, ou pela inoculação de amostras de suspensão de solo a plântulas sob condições assépticas. Os rizóbios capturados desta forma serão obviamente determinados pela especificidade do hospedeiro utilizado. Além de sua capacidade para nodular uma leguminosa, a qual é uma das bases mais aceitáveis para alocação em gênero, um rizóbio pode se classificar de acordo com sua morfologia de colônia (muconoides, aquosas ou secas) (Fuhrmann, 1990), velocidade de crescimento (lento ou rápido) e produção de ácido ou alcali em meio de cultura. Reações sorológicas específicas podem ser particularmente meios de reconhecimento entre estirpes, contudo deve-se ter em mente que na caracterização antigênica, as mesmas estirpes podem apresentar reatividade a diferentes soros (Fuhrmann, 1990). Novas técnicas baseadas no desenvolvimento da biologia molecular constituem ferramentas significativamente melhoradas para o estudo da ecologia rizobiana (Wilson, 1995). Genes marcadores podem permitir detecção específica de estirpes através de simples observação de cor de nódulos ou colônias. Tecnologias DNAsicas, em particular o uso de *fingerprints* consistindo de perfis de amplificação de DNAs gerados pelo uso de sondas (*primers*) aleatórias ou específicas, oferecem os melhores métodos atualmente disponíveis para verificação e identificação de estirpes individuais em cultura pura, como também avaliação rápida e segura da estrutura da população através de *fingerprints* rápidos de grande número de isolados de rizóbios de solo. Tais metodologias não serão aqui descritas.

## Protocolo de análise

### 1. Contagem indireta dos rizóbios através do teste de infecção em plantas

Este método depende da capacidade de um rizóbio específico produzir nódulos em uma determinada leguminosa e assume que uma única célula de rizóbio leva a uma população suficientemente grande, ao redor da raiz, para promover nodulação. O número de tubos com plantas noduladas é indicativo da presença de rizóbios, podendo, enfim, ser utilizado para determinar o número provável deles na suspensão sob teste. A leguminosa hospedeira pode ser testada sobre ágar ou outro substrato (vermiculita) e em sistemas de tubos fechados ou com a parte aérea livre. O número mais provável (NMP) é baseado na tabela de probabilidade de Fisher & Yates (1963) (Tabela 1) a qual leva em consideração o total de casos positivos (nodulados) ou negativos (não nodulados).

**Plântulas testes:** para inoculação, são necessárias plântulas de uma a duas semanas de idade, procedendo-se o seguinte:

1. Preparar tubos de 20x3cm com 15mL do seguinte meio semi-sólido para plantas (outros recipientes para plantas poderão ser utilizados tais como sacos plásticos, vidros esterilizáveis etc.):

Meio para plantas:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,5g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0,2g
NaCl .....	0,1g
Citrato férrico .....	0,01g
CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O .....	0,07g
Água destilada .....	1000mL

Adicionar 0,5mL L<sup>-1</sup> das seguintes soluções de micronutrientes:

---

CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> .....	0,08g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O .....	0,2g
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O .....	2,0g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O .....	0,01g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	1,43g
Água destilada .....	1000mL

2. Esterilizar superficialmente as sementes (5-10 minutos com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado e lavar 6 vezes com água esterilizada);
3. Pré-germinar as sementes em condições estéreis e transferir para os tubos com meio para plantas;
4. Colocar os tubos sob condições controladas ( $\pm 28^{\circ}\text{C}$  e luz do dia artificial) para crescimento e nodulação.

### Preparo das diluições

1. Determinar o peso seco de uma alíquota tomada de amostras do solo peneirado ( $< 2\text{mm}$ ).
2. Pesar uma alíquota de solo natural peneirado, equivalente a 10g de solo seco, em um frasco de 250mL, adicionar 90mL de solução dispersante de polifosfato de sódio [(NaPO<sub>3</sub>)<sub>n</sub>] 0,2% (polifosfato de sódio, 1g; água destilada, 1000mL) e agitar por 30 minutos a 50rpm.
3. Transferir, com auxílio de pipetas estéreis, alíquotas de 1mL da suspensão do solo (de concentração 10<sup>-1</sup>) para tubos com 9mL de água esterilizada (diluição 10<sup>-2</sup>). Agitar vigorosamente o tubo, devidamente tampado, transferir 1mL da diluição 10<sup>-2</sup> para outro tubo com 9mL de água esterilizada (dil.10<sup>-3</sup>) e assim, sucessivamente, até o número esperado de rizóbios. Obs.: amostras de rizosfera, bastante populosa, requerem diluição em série, de pelo menos uma concentração a 10<sup>-8</sup>.

## **Inoculação das plântulas**

Inocular 0,2mL das diluições escolhidas ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) nas plântulas testes com as repetições convenientes (2 ou 4 de acordo com a precisão desejada). Obs.: Alíquotas de 1mL podem ser transferidas quando for utilizado meio inclinado dentro do tubo.

Controles do método: é fundamental que se incluam plântulas inoculadas apenas com a solução diluente (controle branco) e/ou, quando desejado, plântulas inoculadas com diluições apropriadas de cultura pura de rizóbio (controle positivo).

Leitura dos tubos: os nódulos deverão aparecer na 2ª ou 3ª semanas após inoculação. O tempo mais exato de leitura pode ser determinado por inspeção dos tubos inoculados com a cultura pura. A nodulação é anotada como positiva (+) ou negativa (-) para cada tubo.

## **Determinação do número mais provável (NMP)**

A tabela desenvolvida por Fisher & Yates (1963) tem sido utilizada para construir outras, de acordo com o número de diluições e o número de repetições, para uma série de 10 diluições (Tabela 1).

Tabela 1. Número de rizóbios estimado pelo teste de infecção de plantas: diluições 10X (A = 10)

<b>Tubos positivos</b>		<b>Etapas de diluição</b>			
n = 4	n = 2	s = 10			
40	20	$> 7 \cdot 10^2$			
39					
38	19	6,9			
37		3,4			
36	18	1,8			
35		1,0			
34	17	$5,9 \cdot 10^1$			
33		3,1	s = 8		
32	16	1,7	$> 7 \cdot 10^6$		
31		1,0			
30	15	$5,8 \cdot 10^6$	6,9		
29		3,1	3,4		
28	14	1,7	1,8		
27		1,0	1,0		
26	13	$5,8 \cdot 10^5$	$5,9 \cdot 10^5$	s = 6	
25		3,1	3,1	s = 6	
24	12	1,7	1,7	$> 7 \cdot 10^4$	
23		1,0	1,0		
22	11	$5,8 \cdot 10^4$	$5,8 \cdot 10^4$	6,9	
21		3,1	3,1	3,4	
20	10	1,7	1,7	1,8	
19		1,0	1,0	1,0	
18	9	$5,8 \cdot 10^3$	$5,8 \cdot 10^3$	$5,9 \cdot 10^3$	
17		3,1	3,1	3,1	s = 4
16	8	1,7	1,7	1,7	$> 7 \times 10^2$
15		1,0	1,0	1,0	
14	7	$5,8 \cdot 10^2$	$5,8 \cdot 10^2$	$5,8 \cdot 10^2$	6,9
13		3,1	3,1	3,1	3,4
12	6	1,7	1,7	1,7	1,8
11		1,0	1,0	1,0	1,0
10	5	$5,8 \cdot 10^1$	$5,8 \cdot 10^1$	$5,8 \cdot 10^1$	$5,9 \cdot 10^1$
9		3,1	3,1	3,1	3,1
8	4	1,7	1,7	1,7	1,7
7		1,0	1,0	1,0	1,0
6	3	5,8.1	5,8.1	5,8.1	5,8.1
5		3,1	3,1	3,1	3,1
4	2	1,7	1,7	1,7	1,7
3		1,0	1,0	1,0	1,0
2	1	0,6	0,6	0,6	0,6
1		$< 0,6$	$< 0,6$	$< 0,6$	$< 0,6$
0	0				
Amplitude aproximada fator, 95% dos limites de confiança** (x, ±)		$10^9$  n = 2 n = 4	$10^1$  6,6 3,8	$10^3$	$10^3$

Fisher & Yates (1963)

O número mais provável (NMP), correspondente a um particular número de tubos positivos (+), é dado pela menor diluição da série. Assim, a estimativa da contagem por grama ou por mL é determinada pela expressão:

$$x = \frac{m \cdot d}{v \cdot g}$$

onde m = NMP obtido da tabela; d = diluição representada pelo tubo 1; v = volume da alíquota inoculada; g = peso (ou volume) da amostra diluída.

Confiabilidade dos resultados: o erro padrão aproximado aplicável ao  $\log x$  pode ser utilizado para fornecer limites de confiança de 95% ( $P \leq 5\%$ ).

## 2. Isolamento do rizóbio a partir do nódulo

Os nódulos, dependendo de sua fonte, idade e data de coleta, possuirão em sua superfície ou interior outros microrganismos, além de rizóbios. Os nódulos não danificados podem ser cuidadosamente limpos e esterilizados superficialmente para remover tais microrganismos externos. Para tanto, devem ser utilizados nódulos íntegros, recentemente coletados de raízes ou estocados a baixas temperaturas. Os nódulos médios a grandes (2 a 5mm  $\varnothing$ ) podem ser convenientemente manipulados com pinças e os nódulos pequenos podem ser esmagados e inoculados em meios de cultura.

1. Coletar nódulos, selecionados ao acaso, de acordo com o propósito da investigação. Se necessário, cortar um pequeno pedaço da raiz junto ao nódulo para facilitar sua manipulação.
2. Lavar em peneira para eliminar contaminações grosseiras (gotas de detergente auxiliarão nesta parte).
3. Expor rapidamente ao etanol 95% e imergir em solução ácida de  $\text{HgCl}_2$  0,1% ( $\text{HgCl}_2$ , 1g; HCl concentrado, 5mL; água, 1000mL) por 1-30 minutos, de acordo com o tamanho do nódulo e/ou rigor da esterilização. Em geral, 3-4 minutos são suficientes (alternativamente,

podem-se utilizar 3-5% de água oxigenada e neste caso não haverá necessidade do passo seguinte).

4. Lavar pelo menos 6 vezes com água esterilizada.
5. Esmagar ou dissecar os nódulos assepticamente e espalhar o fluído do seu interior sobre a superfície do meio de cultura YMA. Nódulos saudios e ativos apresentam interior róseo.
6. Incubar a 28°C observando as colônias isoladas desenvolvidas no local do estriamento do meio. Notar que, apesar de muitas espécies produzirem colônias gomosas e relativamente grandes após 4-5 dias, outras muito menores aparecerão mesmo depois de 10 dias. A maioria das colônias serão aquosas, translúcidas ou opacas e esbranquiçadas.
7. Tomar uma colônia isolada típica e uniforme e estriar diretamente em meio de cultura ou dispersar em um pouco de água esterilizada (se possível com gotas de detergente) para posterior espalhamento em meio de cultura.
8. Identificar o isolado como *Rhizobium* através de um teste de infecção com o hospedeiro apropriado ou indiretamente por meio de outras características tais como sorológicas, morfológicas, bioquímicas ou genéticas.
9. Manutenção: baixas temperaturas (2°C) permitem a manutenção do isolado em meio de cultura por cerca de 2 anos. Formas de manutenção mais prolongadas incluem uso de óleo mineral, liofilização, anéis de porcelana e solo seco e esterilizado.

### **3. Cultivo do rizóbio em laboratório**

Os rizóbios dos nódulos são bactérias do tipo bastonetes gram-negativos, heterotróficas capazes de utilizar uma ampla gama de carboidratos. Nitrogênio inorgânico combinado ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) é, em geral, suficiente para seu crescimento, mas, dependendo da estirpe, pode requerer um ou mais

aminoácidos e/ou vitaminas para melhor desenvolvimento (Vincent, 1970). São bactérias aeróbicas que se desenvolvem melhor em temperaturas de 25-30°C e pH de 6-7. Além de magnésio, cálcio e cobalto, pouco se conhece a respeito das necessidades de elementos inorgânicos em rizóbio. O seguinte meio de cultivo (YMA) é rotineiramente utilizado para rizóbios:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,5g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0,2g
NaCl .....	0,1g
Manitol .....	10,0g
Extrato levedura .....	0,5g
Água destilada .....	1000mL
pH .....	6,8
Ágar .....	15g

Para meio seletivo e/ou indicador, recomenda-se incorporar 0,002% de actidione (ciclohexamida) ao meio de rotina para suprimir o crescimento de fungos comuns em isolamentos a partir de nódulos senescentes. O uso de vermelho congo (0,025mg L<sup>-1</sup>) pode, também, auxiliar no reconhecimento de rizóbio dentre outras bactérias do solo. Em geral, os rizóbios absorvem mais fracamente o referido corante que outras bactérias. Azul de bromotimol (25 mg mL<sup>-1</sup>) pode também ser utilizado para demonstrar alteração do pH através da produção de álcali ou ácido pelas estirpes de rizóbios.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOTTOMLEY, P. Ecology of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J., ed. **Biological nitrogen fixation**. New York: Chapman & Hall, 1991. p.292-347.
- CARLSON, R.W.; PRICE, N.P.J.; STACEY, G. The biosynthesis of rhizobial lipo-oligosaccharide nodulation signal molecules. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.7, p.684-695, 1994.
- CATLOW, H.Y.; GLENN, A.R.; DILWORTH, M.J. Does rhizobial motility affect its ability to colonize along the legume root? **Soil Biology and Biochemistry**, v. 22, p.573-575, 1990.

- CREGAN, P.B.; KEYSER, H.H.; SADOWSKY, M.J. Host plant effects on nodulation and competitiveness of the *Bradyrhizobium japonicum* serotype strains constituting serocluster 123. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p.2532-36, 1989.
- FISHER, R.A.; YATES, F. **Statistical tables**. 6.ed. [S.l.]: Oliver & Boyd , 1963.
- FUHRMANN, J. Symbiotic effectiveness of indigenous soybean bradyrhizobia as related to serological, morphological, rhizobitoxine, and hydrogenase uptake phenotypes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.224-229, 1990.
- HARDARSON, G.; GOLBS, M.; DANSO, S.K.A. Nitrogen fixation in soybean (*Glycine max* L. Merrill) is affected by nodulation patterns. **Soil Biology and Biochemistry**, v.21, p.783-787, 1989.
- HIRSCH, A.M. Transley review n°. 40: Developmental biology of legume nodulation. **New Phytologist**, v.122, p. 211-237, 1992.
- KEYSER, H.H.; SOMASEGARAN, P.; BOHLOOL, B.B. Rhizobial ecology and technology. In: METTING Jr., P.B., ed. **Soil microbial ecology: applications in agricultural and environmental management**. New York: Marcel Dekker, 1993. p.205-226.
- KUCEY, R.M.N. Responses of field bean (*Phaseolus vulgaris*) to levels of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* inoculation in soils containing effective *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* populations. **Canadian Journal of Plant Science**, v.69, p.419-426, 1989.
- LAWSON, K.A.; BARNET, Y.M.; MCGILCHRIST, C.A. Environmental factors influencing numbers of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and its bacteriophages in two field soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, p.1125-1131, 1987.
- PENA-CABRIALES, J.J.; ALEXANDER, M. Growth of *Rhizobium* in unamended soil. **Soil Science Society of America Journal**, v.47, p.81-84, 1983.
- TRIPLETT, E.W. Construction of a symbiotically effective strain of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with increased nodulation competitiveness. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.98-103, 1990.
- VINCENT, J.M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwel, 1970. (IBP Handbook, 15).
- WILSON, K.J. Molecular techniques for the study of rhizobial ecology in the field. **Soil Biology and Biochemistry**, v.27, p.501-514, 1995.
- WOOMER, P.S.; SINGLETON, P.W.; BOHLOOL, B.B. Ecological indicators of native rhizobia in tropical soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.1112-1116, 1988.

# **IX. A IMPORTÂNCIA DA CELULASE NA DEGRADAÇÃO DE MATÉRIA ORGÂNICA**

Itamar Soares de Melo

## **Introdução**

As enzimas no solo fornecem, entre tantas outras contribuições, uma indicação do potencial do solo para degradar a matéria orgânica natural e compostos xenobióticos.

Os materiais lignocelulósicos, constituídos basicamente de celulose, hemicelulose e lignina, representam a maior porção do carbono fixado pela fotossíntese, do qual somente uma pequena parte é reciclada rapidamente, sendo o restante encontrado na forma de resíduos que podem perfeitamente ser aproveitados, através de processos que transformam essa matéria orgânica em monossacarídeos facilmente fermentáveis.

Embora compreendendo menos de 5% de um solo produtivo, a matéria orgânica (MO) determina profundamente a produtividade do solo. Ela serve

como fonte de alimento para microrganismos, empreende reações químicas, tais como troca iônica e influencia nas propriedades físicas do solo.

A celulose é o constituinte principal da parede celular da maioria das plantas e é um polímero linear de glicose, composto de unidades de anidroglicose associadas às outras por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas. Na natureza, a celulose está organizada em fibrilas, que se constituem de diversas moléculas de celulose arranjadas de forma paralela e ligadas por pontes de hidrogênio.

A capacidade de utilizar a celulose como fonte de carbono e energia é encontrada em bactérias, actinomicetos e fungos. Entre os fungos, os gêneros mais estudados são: *Trichoderma*, *Penicillium*, *Sporotrichum*, *Shizophyllum*, *Fusarium*, *Aspergillus* e *Pleurotus*. Entre as bactérias são conhecidos os gêneros: *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Ruminococcus*. Esses microrganismos oferecem vantagens na bioconversão em escala industrial, reduzindo problemas de contaminação, controle de fitopatógenos etc. Entretanto, o mais conhecido e mais bem caracterizado desse sistema é o do gênero *Trichoderma*, com três classes gerais de enzimas: 1,4-D-glucana celobiohidrolase, que age sobre as extremidades não redutoras da cadeia de celulose, liberando unidades celobiosídicas; 1,4- $\beta$ -D-glucana 4-glucanohidrolase (endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase), a qual cliva as ligações glicosídicas, de uma forma aleatória dentro da molécula do substrato; e 1,4- $\beta$ -D-glucosidase (celobiose;  $\beta$ -D-glicoside glicohidrolase) que, por sua vez, cliva celulo-oligossacarídeos para a produção de glicose (Kubicek et al., 1993; Haran et al., 1996).

A celulase catalisa a hidrólise de celulose em D-glucose e consiste de pelo menos tres enzimas: endo- $\beta$ -1,4-Glucanase, exo- $\beta$ -1,4-glucanase e  $\beta$ -glucosidase.

As propriedades mais importantes que afetam a suscetibilidade de celulose à hidrólise enzimática são: o grau de cristalinidade, a natureza das substâncias associadas e a área da sua superfície. A degradação de celulose

no solo é um processo lento e depende da concentração, localização e mobilidade de celulases.

### **Determinação da atividade celulolítica**

A celulase total pode ser determinada através da liberação de açúcares redutores a partir da hidrólise do algodão, pela perda de peso do substrato Avicel (avicelase), pela redução na turbidez da solução utilizando papel de filtro, liberação de corante na presença de celulose-corante e pela clarificação do ágar em ágar-celulose.

Endoglucanases são determinadas pela liberação de açúcares redutores, utilizando carboximetil celulose (CMCase) como substrato. A atividade Exoglucanase é geralmente determinada pelo aparecimento de açúcares redutores no meio de cultura, na presença de celulose amorfa ou pela hidrólise de substratos celo-oligosacarídeos p-nitrofenil- $\beta$ -D-glicosídeos, produzindo celobiose e p-nitrofenol como produto final. Celobiases ( $\beta$ -glicosidase) são medidas pela hidrólise de celobiose ou anel  $\beta$ -glucosídeos, tais como salicina ou p-nitrofenol- $\beta$ -D-glicosídeos, originando como produtos finais glicose, saligemina e p-nitrofenol, respectivamente.

A presença de açúcares redutores no meio pode ser verificada pelos métodos colorimétricos, tais como ácido dinitrosalicílico – DNS. A separação e caracterização de celulases e  $\beta$ -glicosidases podem ser feitas por métodos de separação de enzimas, filtração em gel, cromatografia de troca iônica e eletroforese.

## Protocolo de análise

### Determinação de celulase total

A celulase total é determinada usando o método modificado de Smith (1977) com meio baseado em Coutts & Smith (1976). O ensaio é baseado no substrato modificado, celulose-azure, que tem um corante ligado. A quebra do substrato somente pode ocorrer se o sistema de celulase total estiver presente, resultando na liberação do corante. A quantidade de difusão do corante e intensidade da coloração fornece uma estimativa da atividade da celulase.

**Meio de cultura** – O meio de cultura compreende a seguinte composição:

Tartarato de amônia .....	2g
Hidrogeno fosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) .....	0,6g
Hidrogeno fosfato dipotássico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) .....	0,4g
Sulfato de magnésio heptaidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) .....	0,5g
Extrato de levedura .....	1g
Solução de elementos traços* .....	120 $\mu\text{L}$
Tiamina-HCl .....	100 $\mu\text{g}$
Agar .....	14g
Água destilada .....	1000mL

\* Composição da solução de elementos traços (p/v): Ácido cítrico 5,0%;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5,0%;  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1,0%;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,25%;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0,05%;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0,05% e  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,05%.

Este meio é vertido em placas de Petri e sobre este, após solidificação, é colocada uma fina camada do mesmo meio, adicionada de 0,5g de celulose-azure (Sigma).

### Determinação de endoglucanase

A atividade de endoglucanase é determinada através do método de Hankin & Anagnostakis (1977), usando o meio de celulose descrito acima. O carboximetilcelulose é usado como substrato na concentração de 1% (peso/vol). A visualização da atividade enzimática requer que a placa contendo o meio seja imersa em uma solução aquosa a 1% de brometo de cetiltrimetil amônio. As placas devem ser deixadas por 4 horas a 4°C. A presença de atividade é indicada pela formação de um denso precipitado em volta das colônias. Tais zonas são mais fáceis de ser visualizadas e medidas com uma fonte de luz abaixo das placas. As medições do crescimento das colônias devem ser feitas antes das placas serem imersas na solução.

### Determinação da $\beta$ -glucosidase

Usando o método de Eberhart et al. (1964), o meio de celulose é suplementado com 0,2% de esculina (6,7-diidroxicumarina-6-glicosídeo) como substrato e 0,05% de citrato férrico de amônia (Montenecourt & Eveleigh, 1979) para exame da atividade de  $\beta$ -glucosidase. Após a quebra da molécula de esculina a esculetina e glicose, um precipitado preto se forma entre o íon férrico e a esculetina, produzindo uma zona escura de cor marron-preta ao redor das colônias com atividade  $\beta$ -glucosidase.

### Dosagem enzimática

**Método 1.** Incubar uma linhagem fúngica produtora de celulase em meio líquido de Czapek (Tuite, 1969):

Nitrato de sódio (NaNO <sub>3</sub> ) .....	3g
Hidrogeno fosfato dipotássico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) .....	1g
Sulfato de magnésio heptaidratado (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O) .....	0,5g
Cloreto de potássio (KCl) .....	0,5g
Sulfato ferroso heptaidratado (FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O) .....	0,01g
Papel de filtro Whatman n° 1* .....	10g

\* O papel de filtro deve ser moído. Na ausência deste, pode-se utilizar fibras de celulose fornecidas pela Sigma.

Culturas são incubadas sob agitação (180rpm) a 28°C, no escuro. Após 3-4 dias, o micélio é colhido por filtração e o sobrenadante é usado para determinar a atividade enzimática extracelular.

**Método 2.** Utiliza-se como meio de cultura farelo de trigo – 40gL<sup>-1</sup> em água destilada. Ferver por 30 minutos e filtrar em gaze duplo. Completar o volume para 1L.

Incubação: Em dois frascos Erlenmeyer de 250mL são colocados 100mL de meio/cada frasco e incubados com 3 discos de 0,5cm de diâmetro de meio ágar (BDA = Batata-Dextrose-Ágar) onde o fungo se desenvolveu. Incubar outros dois frascos sem o inóculo como testemunha. Deixar sob agitação por 7 dias a 180rpm, à temperatura de 28°C. Filtrar o conteúdo de cada Erlenmeyer, separadamente, em papel Whatman nº 1. Para cada filtrado (dois/isolado) procede-se à dosagem das enzimas endoglucanase e β-glucosidase, em duplicata.

**Dosagem de β-glucosidase** – a atividade é avaliada segundo Kubicek (1981). Adiciona-se 0,1mL do filtrado a um tubo contendo 1mL de tampão citrato 50mM, pH entre 4.8-5.0 e 0,1mL de uma solução de p-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo (pNPG) a 50mM em água destilada. Incuba-se por 10 min. a 50°C (banho-maria). Adicionar a cada tubo 2mL de solução 1M de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> para parar a reação. Completar o volume de cada tubo para 10mL com água destilada (em torno de 6,8mL) e fazer a leitura da absorbância a 410nm.

**Dosagem de Endoglucanase** – a atividade da endoglucanase é avaliada através da adição de 0,1mL do filtrado a um tubo contendo 0,9mL de uma solução de carboximetilcelulose a 0,5% de tampão citrato, pH 5 a 50mM. Incuba-se por 24 horas a 50°C (banho-maria). A reação é parada adicionando-se 1mL da solução de ácido dinitrosalicílico (DNS) a 1% (Miller, 1959). Aquece-se novamente a 50°C por 15 minutos. Completa-se o conteúdo do tubo para

10mL (acrescentar cerca de 8mL de água destilada). Procede-se a leitura da absorbância a 540nm.

**Obs.:** 1) Na hora de ferver as amostras, cobrir com papel alumínio para evitar a evaporação. 2) Uma unidade de enzima é definida como a quantidade de enzima que libera um mmol de açúcar redutor, expresso como glucose/minuto sob as mesmas condições. Portanto, é necessário preparar a curva de glucose com solução DNS.

**Preparo das soluções:**

1. Tampão Citrato 50mM – pH 5.0

Citrato de sódio (PM = 294,10)

Para se preparar 1000mL de solução 0,05M, pesar 14,7g de citrato.

2. Carbonato de sódio 1M

Carbonato de sódio (PM = 105,99)

Para se preparar 1000mL de solução 1M, pesar 105,99 g de carbonato.

Ou 10,599g de carbonato para se preparar 100mL.

3. p-Nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo (pNPG) – 50mM

pNPG (PM = 301,3)

Para se preparar 1000mL de solução 0,05M, pesar 3,0g de pNPG. Assim, para 5mL, pesar 0,015g de pNPG.

4. Carboximetilcelulose (CMC) – 0,5% em tampão citrato 50mM.

Pesar 0,5g de CMC e dissolver em 100mL de tampão conforme preparado.

5. Preparo da solução DNS a 1%: 10g de ácido 3,5-dinitrosalicílico; 2g de fenol; 0,5g de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ; 10g de NaOH e 200g de sal de Rochelle ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) em 1000mL de água destilada. Dissolver bem e armazenar em frasco escuro.

**Cuidado!: Usar luvas, óculos de proteção e máscara.  
Preparar dentro da capela com exaustão.  
Extremamente tóxico!**

### Curva-padrão de DNS - ácido 3,5-dinitrosalicílico; qualidade Sigma ou equivalente

1. Preparar 10mL de glucose ( $1\text{mg mL}^{-1}$ ) e fazer as diluições conforme descrito a seguir, para se obter a curva:

Glucose (mL)	Água dest. (mL)	Conc. final de glucose	
		Mg $\text{mL}^{-1}$	$\mu\text{MmL}^{-1}$
0.00	1.00	0.00	0.000
0.05	0.95	0.05	0.278
0.10	0.90	0.10	0.556
0.15	0.85	0.15	0.834
0.20	0.80	0.20	1.112
0.25	0.75	0.25	1.390
0.30	0.70	0.30	1.668
0.35	0.65	0.35	1.946
0.40	0.60	0.40	2.224
0.50	0.50	0.50	2.780
0.60	0.40	0.60	3.336

2. De cada diluição, preparar 3 amostras de 250mL, adicionar 1mL da solução DNS. Cobrir os tubos com papel alumínio e ferver por 10 minutos. Diluir para 10mL com água destilada (isto é, acrescentar 8,75 mL de água). Resfriar e medir absorbância a 550 nm.
3. Corrigir suas amostras baseado na curva padrão, usando-se a regressão. Expressar atividade como Unidades, definir unidade como  $\text{mM mL}^{-1} \text{min}^{-1}$ , por mg de proteína ou mg de micélio.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COUTTS, A.D.; SMITH, R.E. Factors influencing the production of cellulases by *Sporotrichum thermophile*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.31, n.6, p.819-825, 1976.

- EBERHART, B.; CROSS, D.F.; CHASE, L.W. Beta-glucosidase system of *Neurospora crassa*: 1: beta-glucosidase and cellulase activities of mutant and wild-type strains. **Journal of Bacteriology**, v.87, n.4, p.761-770, 1964.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. Solid media containing carboxymethylcellulose to detect cellulase activity of microorganisms. **Journal of Genetics in Microbiology**, v.98, p.109-115, 1977.
- HARAN, S.; SCHICKLER, H.; OPPENHEIM, A.; CHET, I. Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. **Phytopathology**, v.86, p.980-985, 1996.
- KUBICEK, C.P. Release of carboximethylcellulase and  $\beta$ -glucosidase from walls of *Trichoderma reesei*. **European Journal of Applied Microbiology**, v. 13, p.226-231, 1981.
- KUBICEK, C.; MESSNER, R.; GÜBER, F.; MACH, F.; KUBICEK-PRANZ, M.; KUBICEK-PRANZ, E. The *Trichoderma* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 15, p.90-99, 1993.
- MILLER, G.L. The use of the dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, p.426-428, 1959.
- MONTENECOURT, B.S.; EVELEIGH, D.E. Selective screening methods for the isolation of high yielding cellulase mutants of *Trichoderma reesei*. **Advances in Chemistry Series**, v.181, p.289-301, 1979.
- SMITH, R.E. Rapid tube test for detecting fungal cellulase production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 33, n.4, p.980-981, 1977.
- TUITE, J. **Plant pathology methods: fungi and bacteria**. New York: Burgess, 1969. 57p.



# **X. USO DE CROMÓFOROS NA DETECÇÃO DE ENZIMAS EXTRACELULARES DE FUNGOS**

Jane L. Faul  
Milton Ricardo de Abreu Roque

## **Introdução**

Técnicas de detecção de enzimas extracelulares de fungos envolvem, tipicamente, etapas de seu crescimento em meio indicativo específico (ex.: Hankin & Ananostakis, 1975; Gochenaour, 1984) ou leitura em espectrofotômetro (ex.: Bollag & Leonowicz, 1984; Martinez et al., 1988). O sistema API ZYM encontrado no mercado é usado nos estudos micológicos e é capaz de detectar 19 diferentes atividades enzimáticas extracelulares (Bridge & Hawksworth, 1984 e 1985; St Leger et al., 1986).

Métodos que empregam fluoróforos para detecção da atividade enzimática, particularmente 4-metil-umbeliferona, foram desenvolvidos para bacteriologia (ex.: O'Brien & Colwell, 1987). Além disso, os derivados 4-

metil-umbeliferona de lactose e celobiose foram utilizados para diferenciar os componentes da enzima celulase de *Trichoderma reesei* (Claeysens, 1989). No presente método, emprega-se 4-metil-umbeliferona glicosídica para avaliar as enzimas extracelulares de origem fúngica em meios de cultura. Este indicador é extremamente versátil e útil para ser utilizado no "screening" rápido para se detectar o efeito, do meio ambiente ou de algum produto xenobiótico, sobre o metabolismo microbiano.

## Protocolo de análise

### Cultura

Emprega-se cultura do fungo que deseja estudar, crescida em meio líquido glicose-extrato de levedura (GYM; Mugnai et al., 1989). Após cerca de 7 a 9 dias de incubação, o meio de cultura deve ser filtrado e congelado a menos 20°C.

### Substrato fluorescente

Preparar solução-estoque 50mM de 4-metil-umbeliferil- $\beta$ -D-glucosídeo (4MUGlu), 4-metil-umbeliferil- $\beta$ -D-galactosídeo (4MUGal) ou 4-metil-umbeliferil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminídeo (4MUNacGlu) em 1,6mL de dimetilformamida (DMF). Esta solução estoque foi diluída em 0,15 a 9,85mL de solução 0,05M de acetato de sódio (pH 5.4), para todos os testes.

O ensaio de *screening* deve ser feito em poços de microplacas. Adiciona-se 50 $\mu$ L do reagente diluído sobre 50 $\mu$ L do filtrado e incuba-se a 37°C por 4 horas. Após a incubação, adiciona-se 50 $\mu$ L de solução saturada de bicarbonato de sódio em cada teste, e observa-se a fluorescência sob luz ultravioleta de comprimento de onda longa. As determinações são realizadas em duplicatas.

## Resultado

Os resultados são classificados em + = atividade enzimática indicada pela forte fluorescência; w = fraca fluorescência e - = nenhuma reação.

A vantagem deste método, comparado ao do API ZYM, é que produz resposta em apenas duas horas de incubação. Mas, após 4 horas de incubação, os dois métodos resultam em respostas semelhantes.

E a vantagem sobre os métodos tradicionais de determinação, como os descritos no capítulo IX do presente manual, é a rapidez na obtenção dos resultados com pequena quantidade de meio de cultura. O presente método não fornece resultado quantitativo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARTH, M.G.M.; BRIDGE, P.D. 4-Methylumbelliferyl substituted compounds as fluorogenic substrates for fungal extracellular enzymes. **Letters in Applied Microbiology**, v.9, p. 77-179, 1989.
- BOLLAG, J.M.; LEONOWICZ, A. Comparative studies of fungal laccases. **Applied and Environmental Microbiology**, v.48, p.849-854, 1984.
- BRIDGE, P.D.; HAWKSWORTH, D.L. Biochemical tests as na aid to identification of *Monascus* species. **Letters in Applied Microbiology**, v. 1, p.25-30, 1985.
- BRIDGE, P.D.; HAWKSWORTH, D.L. The API ZYM enzyme testing system as na aid to the identification of *Penicillium* isolates. **Mycobiological Sciences**, v.1, p.232-234, 1984.
- CLAEYSSENS, M. Chromophoric and fluorophoric glycosides as tools in biochemical and biotechnological research. **Applied Fluorescence Technology**, v.1, p.11-12, 1989.
- GOCHENAUR, S.E. Fungi of a Long Island oakbirch forest. II. Population dynamics and hydrolase patterns for the soil penicillia. **Mycologia**, v.76, p.218-231, 1984.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. The use of solid media for the detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v. 67, p.597-607, 1975.

- MARTINEZ, M.J.; MARTINEZ, R.; REYES, F. Effect of pectin on pectinases in autolysis of *Botrytis cinerea*. **Mycopathologia**, v.102, p.37-44, 1988.
- MUGNAI, L.; BRIDGE, P.D.; Evans, H.C. A chemotaxonomic evaluation of the genus *Beauveria*. **Mycological Research**, v.92, p.199-209, 1989.
- O'BRIEN, M.; COLWELL, R.R. A rapid test for chitinase activity that uses 4-methylumbelliferyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, p.1718-1720, 1987.
- ST LEGER, R.J.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M. Enzymatic characterization of entomopathogens with the API ZYM system. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.48, p.375-376, 1986.

# **XI. ANÁLISE DE FOSFATASE ÁCIDA E ALCALINA: COMPONENTE DO ÍNDICE DE QUALIDADE BIOQUÍMICA DO SOLO**

Rosa Toyoko Shiraishi Frighetto  
Regina Teresa Rosim Monteiro

## **Introdução**

A qualidade do solo depende de um grande número de propriedades físicas, químicas, biológicas e bioquímicas. Sua caracterização exige a escolha dos parâmetros mais sensíveis a mudanças introduzidas nas práticas de manejo (Elliott, 1994). É, portanto, necessário, desenvolver índices que combinem essas diferentes propriedades e que possam servir como indicadores precisos dos principais processos do solo (Elliott, 1994).

Enzimas extracelulares, incluindo fosfatases, são importantes para a degradação de substâncias orgânicas no solo, p.ex. mineralização de fosfato orgânico. A atividade das fosfatases é influenciada pelas diversas propriedades do solo, pela cobertura vegetal e pela presença de inibidores e

indutores. São fatores importantes para fortalecer a ciclagem de P e a conseqüente melhora na fertilidade e produtividade do solo.

Fosfatase é um nome genérico para descrever um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de ésteres e anidridos do ácido fosfórico. Fosfatase ácida e fosfatase alcalina são hidrolases fosfóricos monoéster (EC 3.1.3) enquanto que fosfodiesterase é uma hidrolase fosfórica do diéster (EC 3.1.4). Estes três grupos de enzimas atuam nas ligações ésteres.

A fosfatase ácida (com o pH ideal entre 4.0-6.5) e fosfatase alcalina (pH entre 9.0-10.0) foram encontradas no solo, e constatou-se a predominância de fosfatase ácida em solos ácidos e em alcalinos a fosfatase alcalina. Mas a sua avaliação é feita em torno de pH neutro (6.5-7.0) (Eivazi & Tabatabai, 1977).

Atividade de fosfatase foi utilizada para se avaliar o efeito da aragem e manejo de resíduos vegetais sobre as propriedades do solo (Deng & Tabatabai, 1997), efeito de bactéria solubilizadora de fosfato e micorrizas no crescimento do tomate e atividade microbiana (Kim et al., 1998) e no desenvolvimento de índice de qualidade do solo correlacionando propriedades biológicas e bioquímicas (Trasar-Cepeda et al., 1998).

## **Protocolo de análise** (Tabatabai & Bremner, 1969; Eivazi & Tabatabai, 1977 e Tabatabai, 1982).

### **Material**

Vidraria: balão volumétrico 100mL (2un)  
balão volumétrico 500mL (4un)  
balão volumétrico 10mL (8un)  
balão volumétrico 50mL (1un)  
tubos de ensaio de vidro, com tampa (16un)  
kitassato de 125mL (14un)  
funil de vidro (14un)  
pipeta de 1mL (5un)  
pipeta de 5mL (2un)  
pipeta volumétrica de 10mL (1un)  
pipeta volumétrica de 2mL (1un)  
pipeta volumétrica de 3mL (1un)  
pipeta volumétrica de 4mL (1un)  
pipeta volumétrica de 5mL (1un)  
filtro de papel Whatman nº 42

### **Reagentes**

padrão analítico de p-nitrofenol (PNP), 99%, Aldrich  
padrão analítico de p-nitrofenil fosfato.6 H<sub>2</sub>O p-NPP, 98%, Aldrich  
ácido maléico, RPE, Carlo Erba  
ácido cítrico, PA, ACS, grau Ecibra  
ácido bórico crist., PA, grau Merck  
NaOH, PA  
HCl, PA  
CaCl<sub>2</sub>, PA  
THAM (= Trizma; tris[hidroximetil]aminometano = Tris)

## Preparo das soluções

### 1. MUB (modified universal buffer) estoque – 100mL

Dissolver 1,21g de THAM; 1,16g de ácido maléico; 1,4g de ácido cítrico; 0,63g de ácido bórico em cerca de 50mL de solução NaOH 1N, transferir para balão volumétrico de 100mL e completar o volume com água destilada. Estocar em refrigerador.

### 2. MUB pH 6.5: preparar somente quando for efetuar a análise. Pipetar 10mL da solução MUB estoque (pipeta volumétrica), acertar pH para 6.5 com solução de HCl 0,1N e ajustar o volume para 50mL com água destilada.

### 3. MUB pH 11: pipetar novamente 10mL da solução MUB estoque, acertar pH para 11 com solução de NaOH 0,1N e ajustar o volume para 50mL com água destilada. Esta solução destina-se a avaliar a atividade de fosfatase alcalina.

### 4. Solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH) 1M: pesar 20g de NaOH, transferir para balão volumétrico e acrescentar água destilada.

### 5. Solução de HCl 0,1N: (densidade do ácido = 1,185 e pureza = 37%). Pipetar 4,2mL do ácido e gotejar sobre aproximadamente 200mL de água destilada contida no balão volumétrico de 500mL e acertar o volume com água destilada.

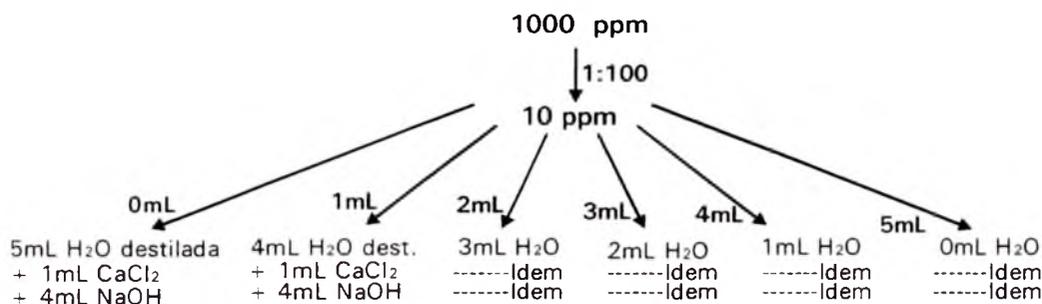
### 6. Solução de cloreto de cálcio 0,5M: pesar 36,75g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , transferir para balão volumétrico de 500mL e acrescentar água destilada completando o volume.

### 7. Solução aquosa de hidróxido de sódio 0,5M: pesar 10g de NaOH, transferir para balão volumétrico de 500mL e acrescentar água destilada até completar o volume.

### 8. Solução padrão de p-nitrofenol: preparar quando for efetuar a análise. Pesar 0,01g de PNP, transferir para balão volumétrico de 10mL. Acrescentar 0,7mL de água destilada, colocar no banho de ultra-som

e quando o reagente estiver totalmente dissolvido, completar o volume com água destilada. É possível estocar em refrigerador por uma semana.

A curva-padrão foi preparada com as diluições conforme o fluxograma a seguir:



9. Solução de p-nitrofenil fosfato dissódico hexahidratado (PM = 371,14g) 0,025M: preparar quando for efetuar a análise. Pesar 0,0928g, transferir para balão volumétrico de 10mL e completar o volume com solução MUB pH 6.5.

**PS:** A referência original utilizou solução 0,015M e o sal tetrahidratado. Para nossas amostras houve necessidade de adequar a concentração devido à característica muito argilosa dos solos analisados.

### Procedimento

Pesar 4 x 1g de solo (<2mm) de cada amostra em tubo de ensaio (dois serão brancos e dois serão amostras). Adicionar 0,2mL de tolueno e 4mL de MUB pH 6.5. Acrescentar 1mL de p-NPP em MUB somente nas amostras. Agitar, fechar os tubos e incubar a 37°C por uma hora. Após a incubação, adicionar 1mL de CaCl<sub>2</sub> 0,5M e 4mL de NaOH 0,5M. Agitar e filtrar a suspensão em papel de filtro. Proceder à leitura no espectrofotômetro a

400nm. Para os brancos, adicionar 1mL da solução de p-NPP após a adição da solução de cloreto de cálcio 0,5M e 4 mL de NaOH 0,5M, imediatamente antes de filtrar a suspensão de solo.

**Obs.:** Adiciona-se solução de  $\text{CaCl}_2$  para interromper a reação e para evitar a coloração marrom causada pela matéria orgânica. A solução de NaOH é para extrair o p-nitrofenol liberado (Tabatabai & Bremner, 1969).

A fosfatase alcalina é determinada da mesma forma descrita anteriormente, substituindo-se a solução MUB pH 6.5 pela solução MUB pH 11.

### Cálculo

Corrigir os resultados para o controle e calcular o p-nitrofenol por mililitro de filtrado, referindo-se à curva de calibração.

$$\text{p-nitrofenol (mg x g}^{-1}\text{de solo x h}^{-1}\text{)} = \frac{C \times v}{\text{PSS} \times \text{SW} \times t}$$

onde: C = concentração de p-nitrofenol medido (mg x mL<sup>-1</sup>de filtrado);

v = volume da suspensão de solo em mililitros;

PSS = peso seco de 1g de solo;

SW = peso do solo usado (1g);

t = tempo de incubação em horas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DENG, S.P.; TABATABAI, M.A. Effect of tillage and residue management on enzyme activities in soils: III. phosphatases and arylsulfatase. **Biology and Fertility of Soils**, v.24, p.141-146, 1997.

EIVAZI, F.; TABATABAI, M.A. Phosphatases in soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v.9, p.167-172. 1977.

- ELLIOTT, E.T. The potential use of soil biotic activity as an indicator of productivity, sustainability and pollution. In: PANKHURST, C.E.; DOUBE, B.M.; GUPTA, V.V.S.R.; GRACE, P.R., ed. **Soil biota: management in sustainable farming systems**. Melbourne: CSIRO, 1994. p.250-256.
- KIM, K.Y.; JORDAN, D.; MCDONALD, G.A. Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. **Biology and Fertility of Soils**, v.26, p.79-87, 1998.
- TABATABAI, M.A. Soil enzymes. In: PAGE, A.L.; MILLER, R.H.; KEENEY, D.R., ed. **Methods of soil analysis**. Part 2. Chemical and microbiological properties. Madison: American Society of Agronomy, 1982. p.903-948.
- TABATABAI, M.A.; BREMNER, J.M. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. **Soil Biology and Biochemistry**, v.1, p.301-307, 1969.
- TRASAR-CEPEDA, C.; LEIRÓS, C. GIL-SOTRES, F.; SEOANE, S. Towards a biochemical quality index for soils: Na expression relating several biological and biochemical properties. **Biology and Fertility of Soils**, v.26, p.100-106, 1998.



# **XII. MÉTODOS PARA DETECÇÃO DAS MUDANÇAS QUÍMICAS NA RIZOSFERA**

Rosa Toyoko Shiraishi Frighetto  
Pedro José Valarini

## **Introdução**

As raízes de plantas e as atividades microbiológicas do solo podem influenciar grandemente a disponibilidade e absorção de nutrientes minerais deste por diversos mecanismos, como a liberação de exsudatos, prótons, íons bicarbonato e ectoenzimas. Estes mecanismos são de particular importância para solos em condições de baixa disponibilidade de nutrientes.

Baseados principalmente em ágar como meio, várias técnicas estão disponíveis para visualizar as mudanças químicas que podem ocorrer na rizosfera de plantas cultivadas, em resposta aos manejos adotados.

# 1. Método para detecção da atividade de fosfatase ácida na rizosfera (Dinkelaker & Marschner, 1992)

Em solos com altas concentrações de fósforo orgânico (solos ácidos de florestas), as fosfatases na rizosfera têm um papel importante no mecanismo de absorção de fósforo pelas raízes de plantas. Pela ação destas enzimas, os compostos orgânicos fosforados são hidrolisados para formas inorgânicas para permitir o seu aproveitamento pelas plantas. A atividade da fosfatase ácida na rizosfera pode ter sua origem na raiz das plantas, nos fungos (como as ectomicorrizas) ou nas bactérias. As raízes e os fungos produzem fosfatases ácidas, enquanto que as bactérias produzem também fosfatase alcalina. Sob condições de deficiência de fósforo, a atividade de fosfatase ácida se intensifica bastante na superfície das raízes de diversas plantas (Caradus & Snaydon, 1987; McLachlan, 1980). Em raízes não micorrizadas esta atividade está associada, principalmente, com a própria raiz e não com os microrganismos.

O princípio do método é o seguinte:



## Protocolo de análise

### Preparo do solo

Passar o solo, seco ao ar, pela peneira de malha 2mm e calcular o seu uso para aproximadamente 300g de solo em cada caixa. Utilizar as seguintes concentrações de fertilizantes para os ensaios:

5 mg P/100g solo (~ 150kg P/ha): 10mL de solução 0,05M  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$   
2 mg Mg/100g solo (~ 60kg Mg/ha): 1mL de solução 0,5M  $\text{MgSO}_4$   
8 mg K/100g solo (~ 240kg K/ha): 2.5mL de solução 0,5M KCl  
10 mg N/100g solo (~ 300kg N/ha): 4.0mL de solução 0,5M  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ .

Em caso de substituir nitrato de cálcio por sulfato de amônio, deve-se adicionar inibidor de nitrificação, em concentração de  $10\mu\text{g}/500\text{ g}$  de solo, na solução de fertilizante. Misturar bem antes de aplicá-la.

Diluir as soluções com água destilada para se obter um volume final de 48mL/600 g solo. A solução deve ser aplicada ao solo lentamente, misturando sempre muito bem. O conteúdo final da água no solo deve ser de aproximadamente 8%, e esse nível deverá ser mantido durante todo o experimento.

### **Preparo do solo na caixa de ensaio**

O fundo da caixa deve ser forrado com papel de filtro úmido para assegurar a uniformidade da umidade do solo.

A caixa deve ser cuidadosamente enchida com aproximadamente 300g de solo peneirado (malha 2mm) para cada caixa.

### **Pré-cultivo das plantas para ensaio**

As sementes de milho são germinadas sobre vermiculita ou papel de filtro umedecido com solução saturada de sulfato de cálcio, durante 3 dias a  $25^\circ\text{C}$ .

### **Crescimento das plantas nas caixas de ensaio**

Sementes pré-germinadas, com raiz de cerca de 2-3cm de comprimento, são plantadas no topo das caixas, que são fechadas com tampa transparente. Entre o solo e a tampa, coloca-se uma folha de plástico transparente para assegurar a abertura da tampa, sem que ela grude na raiz, no final do experimento.

As caixas são cobertas com plástico preto para evitar o crescimento de algas. E, para assegurar o crescimento das raízes ao longo da caixa, posiciona-se esta com inclinação num ângulo de 45°, com a tampa voltada para o lado de baixo. Durante o crescimento, as caixas são mantidas em câmaras de crescimento (BOD) a 25°C em regime de luz 16/8h dia/noite.

### **Reagentes**

- 1-naftilfosfato de sódio (Merck ou similar)
- Sal de diazônio Fast Red TR (= 2-amino-5-cloro-tolueno 1,5-naftaleno-dissulfonato diazotizado)
- citrato trisódico

### **Preparo das soluções**

- Tampão citrato: solução 50mM de citrato trisódico pH 5.6 (acertar com HCl 1M). Esta solução pode ser armazenada a 0-4°C, por várias semanas.
- Solução do substrato: 37,5mM de sal 1-naftilfosfato de sódio em tampão citrato.
- Solução de Fast Red TR: 2,7mM de Fast Red TR em tampão citrato

Obs.: as soluções do substrato e do corante devem ser preparadas no momento do uso.

As soluções do substrato e do corante são misturadas na proporção de 1:10 (v/v) e colocadas em placa de Petri. Mergulhar o papel de filtro nessa mistura, por alguns segundos, retirar e enxugar o excesso da solução com papel absorvente. Deixar secar dentro de uma capela com exaustão. Após a secagem, cortar as bordas do papel de filtro, que normalmente ficam com concentração mais elevada dos reagentes.

Para demonstrar a especificidade do método, mais papéis de filtro devem ser preparados adicionando-se heptamolibdato de amônio nas soluções de

ensaio acima descritos, nas concentrações finais de 100 e 1000mM de molibdato. O molibdato tem a função de inibir atividade de fosfatase ácida.

Outros papéis de filtro (sem o molibdato) devem ser preparados com soluções de ensaio a pH 5.0, 7.0, 9.0 e 11.0.

A estocagem desses papéis não deve ultrapassar dois dias, durante os quais os filtros devem permanecer embrulhados em papel alumínio e guardados em dessecador.

Para a visualização da atividade de fosfatase ácida na rizosfera, a tampa da caixa deve ser removida e o papel de filtro impregnado deve ser colocado na superfície, recolocando-se a tampa durante o período da reação (em média de 60 a 120 minutos). Retirar o papel de filtro e secar, visualizando-se a região da raiz que apresentou a atividade de fosfatase ácida com coloração vermelho escuro.

## **2. Método para detecção da mudança de pH da rizosfera** (Marschner & Römheld, 1983; Häussling et al., 1985)

A composição química da rizosfera difere daquela do solo não-rizosférico como conseqüência da absorção de água e nutrientes minerais, mudança no pH do solo induzida pelas raízes, exudatos de raízes como açúcares, ácidos orgânicos, fenólicos e ectoenzimas como fosfatase ácida, e atividade microbiana. Muitos desses processos podem influir na disponibilidade de nutrientes minerais, como P, Fe, Mn, Zn, Cu e também na solubilidade de elementos tóxicos como Al.

A mudança no pH da rizosfera induzida pelas raízes pode advir de várias causas, tais como: respiração da raiz e correspondente liberação de CO<sub>2</sub>, desequilíbrio na absorção de cátion e ânion – particularmente dependente de fonte de nitrogênio, secreção de ácidos orgânicos ou aumento da liberação de H<sup>+</sup> resultante da deficiência de Fe.

A mudança no pH pode ter consequência sobre a atividade microbiana e particularmente sobre a disponibilidade de elementos minerais. A densidade populacional relativamente alta de bactérias nitrificadoras na rizosfera de solos ácidos, com pH entre 4.1-4.5, foi relacionada ao aumento do pH induzido pelas raízes em zona basal (Smit & Woldendorp, 1981).

## **Protocolo de análise**

O método baseia-se no uso de ágar como meio e bromocresol púrpura como indicador de pH.

O método de preparo do solo e a germinação das plantas usadas no teste é aquele descrito para detecção de fosfatase ácida.

### **Preparo do meio ágar com indicador de pH**

Suspendem-se 3,75g de ágar-ágar (Merck ou similar) em 300mL de água destilada e aquecida até o ponto de fervura em banho-maria, por 15 minutos. Após esse período, adicionam-se 3mL de solução aquosa de bromocresol púrpura (1% w/v ajustado para pH 6.0), e ajusta-se o volume para 500mL. Se necessário, o pH da solução de ágar deve ser ajustado, com  $H_2SO_4$  1N, para 5.8-6.0 (coloração avermelhada). Esta solução pode ser guardada a 40-60°C, em banho-maria, por 24 horas.

### **Preparo da solução de bromocresol púrpura**

Suspender um grama (1g) de bromocresol púrpura (ácido livre e insolúvel em água) (indicado para se medir pH entre 4.5-7.5) em 80mL de água destilada, em um Erlenmeyer. Sob agitação contínua, utilizando agitador magnético, adicionar gota a gota uma solução 1N de NaOH. Durante esse procedimento, o pH não deve exceder 9.0. Após a solubilização completa do indicador (após ~30 minutos), ajustar o pH da solução para cerca de 6.0 utilizando uma solução 1N de  $H_2SO_4$ .

P.S.: Para medidas de pH entre 3.8-5.4, pode-se usar o bromocresol verde.

### **Método com placa de ágar pré-fixada**

A solução de ágar contendo indicador de pH é vertida sobre a superfície lisa das caixas de ensaio, onde deve permanecer para esfriar. Esse procedimento permite preparar placas de ágar relativamente finas (cerca de 2-3mm de espessura). As caixas com placas de ágar podem ser armazenadas a baixa temperatura e alta umidade (evitar ressecamento).

Para se medir o pH da rizosfera, retirar a placa de ágar e colocar sobre a interface entre a raiz e o solo. A mudança no pH do ágar pode ser visualizada em questão de minutos. O método pode ser aplicado mesmo em condições de campo.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- CARADUS, J.R.; SNAYDON, R.W. Aspects of phosphorus nutrition of white clover populations. II. Root exocellular acid phosphatase activity. **Journal of Plant Nutrition**, v.10, p.287-301, 1987.
- DINKELAKER, B.; MARSHNER, H. In vivo demonstration of acid phosphatase activity in the rhizosphere of soil grown plants. **Plant and Soil**, v.144, p.199-205, 1992.
- HÄUSSLING, M.; LEISEN, E.; MARSCHNER, H.; RÖMHELD, V. An improved method for non-destructive measurements of the pH at the root-soil interface (rhizosphere). **Journal of Plant Physiology**, v.117, p.371-375, 1985.
- MARSCHNER, H.; RÖMHELD, V. In vivo measurement of root-induced pH changes at the soil-root interface: effect of plant species and nitrogen source. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, v.111, p.241-251, 1983.
- MCLACHLAN, K.D. Acid phosphatase activity of intact roots and phosphorus nutrition in plants. I. Assay conditions and phosphatase activity. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.31, p.429-440, 1980.
- SMIT, A.; WOLDENDORP, W. Nitrate production in the rhizosphere of plantago species. **Plant and Soil**, v.61, p.43-52, 1981.



# **XIII. ANÁLISE DA ATIVIDADE DE DESIDROGENASE**

Rosa Toyoko Shiraishi Frighetto

## **Introdução**

Nesta análise, o cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) é utilizado como receptor artificial de elétrons e será reduzido pela ação de enzimas desidrogenase, formando o composto trifeniltetrazólio formazan (TTF), um precipitado insolúvel em água, vermelho, mas solúvel em solventes orgânicos (etanol ou metanol) e medido colorimetricamente. Quase todos os microrganismos reduzem TTC a TTF (Figura 1) e o presente ensaio indica convenientemente a atividade das desidrogenases envolvidas, o que permite sua aplicação na medida do impacto de moléculas tóxicas sobre a atividade microbiana (Bitton & Koopman, 1989).

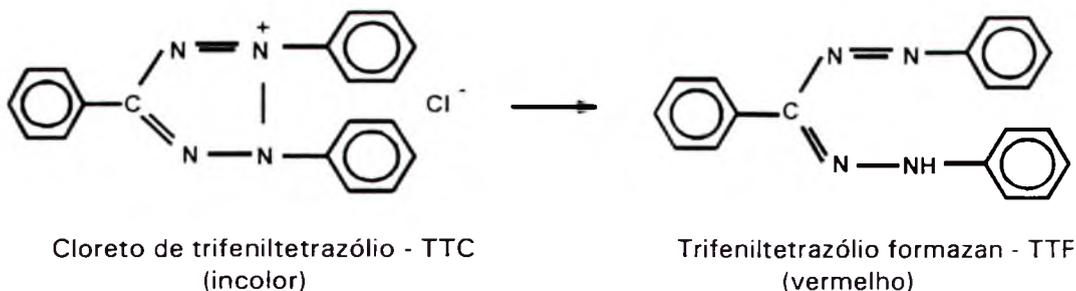


Figura 1. Mecanismo de redução do TTC a TTF

## Protocolo de análise (Casida et al., 1964)

### Reagentes

Trifeniltetrazólio formazan P.A., qualidade Sigma ou similar  
 Cloreto de trifeniltetrazólio P.A., qualidade Sigma ou similar  
 Metanol P.A., qualidade Merck ou similar

### Materiais

Tubos de ensaio de vidro Pyrex, capac. 20mL, com tampa rosqueável  
 Pipetas volumétricas e graduadas  
 Banho-maria  
 Balão volumétrico  
 Centrífuga  
 Espectrofotômetro

Pesar 5g de solo em um tubo de ensaio com tampa rosqueável e adicionar 5mL de solução TTC a 1% em água. Agitar vigorosamente em agitador de tubos até completa homogeneização. Colocar em banho-maria a 37°C durante 24h, e agitar os tubos esporadicamente.

Após esse período, extrair com 10mL de metanol, agitar e decantar o solo. Retirar o sobrenadante com pipeta Pasteur transferindo-o para tubos de centrífuga. Fazer o mesmo procedimento mais uma vez. Centrifugar a solução por 10 minutos a 3400rpm.

Transferir o sobrenadante para uma cubeta e efetuar a leitura em espectrofotômetro a 485nm, com abertura de fenda 2.

### Curva-padrão de TTF

Preparar solução de TTF a 30ppm (3mg/100mL) em metanol P.A.. A partir dessa solução-estoque, fazer diluições, pipetando-se volumes de 1 a 9 mL para balões volumétricos de 10 mL, completando-se o volume do balão com metanol PA.

Dessa forma, obtêm-se concentrações que variam de 3 a 27ppm.

Fazer a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 485nm, e fazer gráfico de absorbância x concentração (Figura 2).

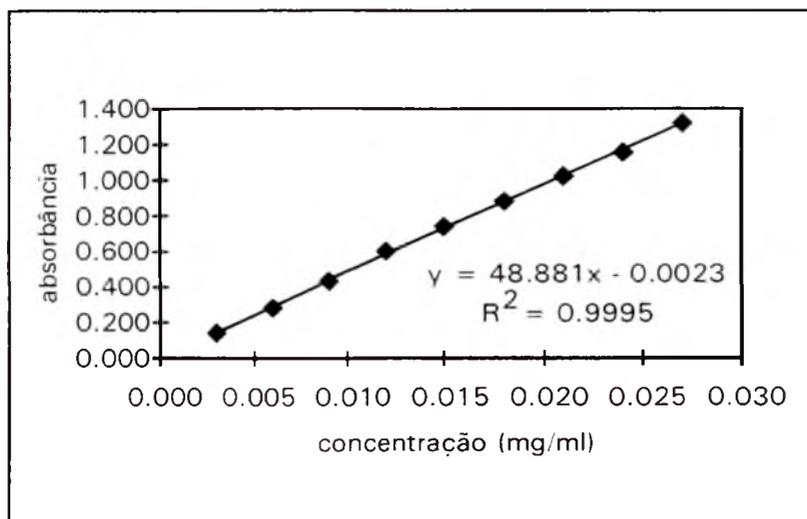


Figura 2. Curva-padrão de TTF (absorbância versus concentração)

## Resultados

Através da curva padrão de TTF (1,3,5- Trifenilformazan), podem-se encontrar os valores das concentrações para cada tipo de solo, pela equação de reta:

$$y = ax + b$$

onde:

x = concentração da amostra

y = absorvância

b = interseção

a = inclinação

O valor da concentração encontrado tem unidade de  $\text{mg/mL}^{-1}$ . Como na amostra utilizaram-se 25mL, multiplica-se o valor encontrado por 25.

Sabendo-se que 1mg de TTF equivale a 150,35 $\mu\text{l}$  de H e conhecendo-se quantos mg são formados em cada amostra, faz-se a seguinte relação:

1mg \_\_\_\_\_ 150,35 $\mu\text{l}$  de H

xmg \_\_\_\_\_ y  $\mu\text{l}$  de H

Divide-se o valor encontrado pelo peso seco do solo;

Finalmente faz-se a correção da umidade.

### Correção da Umidade

Multiplica-se o valor da umidade pela concentração encontrada no respectivo solo, resultando um valor z.

Soma-se então esse valor z à concentração antiga, obtendo-se, assim, a correção da umidade.

**Obs.:** Em solos com alto teor de argila, recomenda-se o uso de solução de TTC a concentração de 1,5%.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BITTON, G.; KOOPMAN, B. Biochemical tests for toxicity screening. IN: BITTON, G.; DUTKA, B.J., ED. **Toxicity testing using microorganisms**. Boca Raton: CRC Press, 1989. v.1, p.32-33.

CASIDA Jr., L.E.; KLEIN, D.A.; SANTORO, T. Soil dehydrogenase activity. **Soil Science**, v.98, p.371-376, 1964.



# **XIV. DETERMINAÇÃO DE MICRORGANISMOS METABOLICAMENTE ATIVOS EM AMBIENTES NATURAIS, POR CTC (5-CYANO-2,3-DITOLUYL TETRAZOLIUM CHLORIDE)**

René Peter Schneider

## **Introdução**

O conhecimento da fração de microrganismos fisiologicamente ativos de uma população microbiana em ambientes naturais é uma das informações mais importantes em ecologia microbiana. Enquanto que os métodos de contagem total de células microbianas por meio de fluorocromos, como por exemplo, a acridina laranja ou DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindol) estão relativamente bem estabelecidos, a determinação do número de microrganismos ativos está sujeita a muitas incertezas. Primeiramente, deve-se definir o que poderia ser considerado um microrganismo ativo para depois verificar se os métodos utilizados para a determinação destes

organismos são adequados ou não. Em termos de molécula, a atividade microbiana consiste em uma seqüência de reações químicas coordenadas, que permitem ao organismo gerar energia, biomassa ou liberação de alguma substância ao meio ambiente. O resultado desta atividade é a transformação de substâncias. A atividade metabólica pode resultar na produção de biomassa, com ou sem divisão de células, na produção de algum metabólito ou na mera sobrevivência do organismo, caracterizada pela manutenção de sua integridade física e fisiológica, mas sem alteração da quantidade de biomassa por célula ou mesmo com redução do valor deste parâmetro. No meio ambiente, todas estas manifestações de atividade microbiana ocorrem simultaneamente, sendo que a grande maioria dos organismos se encontram em estado de senescência, também denominado "viável, mas não cultivável". Somente pequena parte das células se encontra na fase de crescimento, que depende da disponibilidade de suprimento adequado de nutrientes. Este suprimento pode variar dependendo da sazonalidade, do horário do dia, ou mesmo de processos mais aleatórios, como o contato do microrganismo com excrementos ou mesmo cadáveres. Além disso, grande parte dos microrganismos no meio ambiente (solo em particular) vive associada a superfícies na forma de biofilmes.

A diversidade de compostos orgânicos do meio ambiente que pode ser utilizada por microrganismos é enorme devido ao papel desses organismos na reciclagem de nutrientes. A análise de amostras ambientais por meio de métodos de determinação de bactérias em amostras ambientais, cujos organismos dependem da formação de colônias em meios de cultura sólidos, muitas vezes, produzem resultados inferiores por várias ordens de grandeza em relação à contagem total de microrganismos. O baixo número de microrganismos ativos nestes meios ocorre devido aos seguintes fatores:

- somente pequena parte dos microrganismos presentes no meio ambiente está na fase de crescimento;
- muitos organismos no meio ambiente têm crescimento lento. Sua detecção demandaria tempos de incubação de várias semanas, com

as colônias de crescimento mais lento sendo encobertos por colônias de crescimento mais rápido;

- a grande diversidade metabólica dos microrganismos do meio ambiente dificulta sua replicação nos meios de cultura.

Uma quantificação dos microrganismos ativos em um ambiente mais realista pode ser feita com métodos de identificação direta das bactérias ativas, como por exemplo a incubação de microrganismos com substratos cuja redução em algum ponto da cadeia respiratória produz compostos coloridos ou detectáveis por fluorescência. Os indicadores citoquímicos mais usados nestas medições são derivados de sais de tetrazólio (Thom et al., 1993). O 2-(p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-feniltetrazólio (INT) é o composto mais utilizado para quantificação da atividade de microrganismos em amostras ambientais, principalmente em situações onde a quantificação pode ser feita após a extração do produto de redução do tetrazólio, a formazana. A redução intracelular do INT produz um cristal de formazana detectável por microscopia de campo claro. O método, porém, não permite a visualização do cristal em ambientes opacos.

Um outro derivado do sal tetrazólio, o cloreto de 5-ciano-2,3-ditoluil tetrazólio (CTC), quando reduzido, produz um composto que se acumula no interior da célula e pode ser detectado pela fluorescência vermelha (excitação: 380 nm, emissão: 602 nm, coeficiente de extinção:  $1,624 \times 10^4 \text{ L/mol}^{-1} \times \text{cm}$  (Rodriguez et al., 1992). A combinação do CTC com um marcador de DNA que produza fluorescência em um comprimento de onda diferente, como por exemplo, o DAPI (excitação: 340nm; emissão: 450nm), permite analisar, em uma mesma amostra, a quantidade total de células (contagem dos organismos marcados com DAPI) e os organismos ativos naquele ambiente (contagem com CTC).

Estudos comparativos sobre os sítios de abstração de elétrons na cadeia respiratória de *E. coli* indicam que com o INT os elétrons são abstraídos das enzimas succinato e NAD(P)H desidrogenase, da ubiquinona e dos citocromos b555 e b556, enquanto que, no caso do CTC, os elétrons são transferidos

das duas desidrogenases (Smith & McFethers, 1997). A oxidação de  $O_2$  está mais diretamente acoplada à redução do CTC do que do INT (Smith & McFethers, 1997).

O teste de CTC pode ser utilizado para quantificação de microrganismos ativos em amostras de água (Ullrich et al. 1996; Tholozan et al., 1999; Kawai et al., 1999), em biofilmes microbianos (Rodriguez et al., 1992; Schaule et al., 1993), no solo (Yu et al., 1995; Winding et al., 1994) e ar (Hernandez et al., 1999).

## Interpretação dos resultados

A interpretação dos resultados do teste, porém, requer alguns cuidados (Ullrich et al., 1996). O teste baseado na redução de um composto por elétrons desviados da cadeia de transporte de elétrons afetará a taxa de crescimento do organismo. Teoricamente o seqüestro de elétrons em nível de succinato e NAD(P)H- desidrogenases reduz a produção de ATP na cadeia respiratória de 3 ATP's para somente um ATP. Na prática, esta retirada nunca funciona com eficiência máxima. Dados obtidos por Smith & McFethers (1997) indicam que a relação entre consumo de oxigênio e redução de formazana em células de *E. coli* é de cerca de 5 para 1, ou seja 5 moles de oxigênio são consumidas para cada mol de formazana produzida, o que indica que somente 20% dos elétrons da cadeia de transporte de elétrons são absorvidos pelo CTC. A redução da disponibilidade de energia na célula também afetará a capacidade do microrganismo em absorver compostos, como por exemplo a glucose, que, devido à sua reduzida concentração em ambientes naturais, são assimilados por sistemas de transporte dependentes de ATP. Todos estes fatores contribuem para reduzir a taxa de crescimento de organismos expostos ao CTC ou a outros compostos de atuação similar. Ullrich et al. (1996) afirmaram que as taxas de crescimento calculadas com base em dados sobre a quantidade de microrganismos ativos obtidas com CTC seriam

superestimadas e irreais, comparadas às taxas calculadas com compostos radioativos. O cálculo utilizado é, porém, questionável. O consumo de timidina radioativa medido na amostra foi dividido pelo número de microrganismos ativos determinados por auto-radiografia, muito maior do que o número de organismos ativos no teste de CTC. Este cálculo, obviamente, resulta em uma superestimação da taxa de crescimento dos organismos marcados com CTC. O correto seria determinar a taxa de conversão de substratos radioativos separadamente para os organismos marcados com CTC e depois determinar as suas taxas de crescimento. Este exercício, porém, indica claramente o significado do teste de CTC. A redução de CTC ocorre primordialmente no interior de células com taxas de metabolismo significativas, pois só serão detectados os organismos onde a abstração de cerca de 20% dos elétrons transferidos na cadeia respiratória reduz uma quantidade de CTC suficiente para detecção por fluorescência. O teste, portanto, identifica os organismos mais ativos em um ambiente. Organismos com metabolismo mais lento só serão detectados com métodos radioativos. Apesar de seu maior número (Ullrich et al., 1996), a sua contribuição para as taxas de biotransformação total em um ambiente será consideravelmente menor do que a contribuição das células com metabolismo mais intenso detectadas com CTC.

Trabalhos sobre formas viáveis, mas não cultiváveis de microrganismos indicam que o teste de CTC detecta níveis muito reduzidos de metabolismo. Em experimentos sobre a formação de células viáveis, mas não cultiváveis de *Campylobacter jejuni*, o número total de células detectado por DAPI permaneceu inalterado em  $10^8/\text{mL}^{-1}$  durante os 30 dias do experimento, o número de organismos detectáveis por plaqueamento diminuiu para menos de  $1\text{CFU mL}^{-1}$  após 16 dias e o número de células detectáveis por CTC permaneceu por volta de  $10^7/\text{mL}^{-1}$  durante os últimos 14 dias do experimento (Tholozan et al., 1999). Resultados similares foram obtidos com *Salmonella typhimurium* em solos (Marsh et al., 1998).

## Procedimento

O teste de CTC pode ser feito tanto com os substratos naturais presentes no ambiente, ou seja, sem a adição de fontes de nutrientes exógenas, como com substratos adicionados ao meio. Antes de cada experimento, devem ser feitos alguns experimentos para otimização do teste. Os seguintes fatores devem ser considerados:

- **Tempo de incubação:** é o tempo de exposição da amostra que permite detectar o maior número de células ativas. O tempo de incubação ideal varia entre 4 e 6 horas para solos (Winding et al., 1994; Yu et al., 1995) a 1 hora, no caso de amostras de água (Schaule et al., 1993; Kawai et al., 1999). O tempo ideal de incubação deve ser determinado separadamente para cada tipo de amostra. Tempos mais curtos produzirão resultados mais representativos para as amostras, pois incubação prolongada pode ativar o metabolismo de células senescentes.
- **Concentração de CTC:** as concentrações ideais de CTC para incubação variam entre 2mM e 10mM e devem ser determinadas em experimentos preliminares.
- **Forma de incubação:** as amostras devem ser agitadas, se possível, durante o período de incubação
- **Adição de substratos:** a adição de substratos às amostras pode estimular a produção de CTC. Nem todos os substratos são, porém, adequados para este fim. Deve-se também considerar que esta adição altera as condições metabólicas das células e que nem todos os organismos presentes na amostra reagirão da mesma forma a uma substância. Se o objetivo do experimento for o estudo de sistemas naturais, é recomendável conduzir os testes de CTC somente com os substratos naturalmente presentes na amostra.

### Formato do teste

O teste é simples e demanda poucos equipamentos específicos: microscópio de fluorescência, sistema de filtração de amostras (de preferência membrana de 0,2mm), corantes (CTC e DAPI, qualidade Sigma ou equivalente), água destilada ou de qualidade similar. No caso de amostras de solo, a incubação com CTC pode ser feita diretamente no solo, sendo as bactérias separadas e coletadas em filtros após o término da incubação. No caso de amostras de água, a incubação com CTC pode ser feita diretamente na amostra, sendo esta analisada diretamente ou indiretamente, após a coleta dos microrganismos em um filtro.

Recomenda-se preparar uma solução com alta concentração de CTC (solução-estoque), diluindo-se a quantidade apropriada do composto em água destilada ou filtrada por sistemas como por exemplo Milli-Q, ambas esterilizadas. A concentração de CTC nesta solução-estoque deve ser calculada de maneira a permitir diluições que não alterem demasiadamente o volume da amostra. Após a adição do CTC, a amostra deve ser incubada durante o tempo ideal estabelecido nos experimentos preliminares.

A análise do resultado é feita por microscopia de fluorescência, utilizando-se os filtros apropriados para excitação (380nm) e detecção da fluorescência emitida (602nm). O teste pode ser complementado com o método de contagem total de microrganismos baseado na marcação com DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindol, excitação: 340nm; emissão: 450nm, Yu et al., 1995). DAPI também é preparado como solução-estoque em água destilada ou similar, sendo adicionado à amostra a uma concentração de 1 mg/ml. Esta incubação é feita após a incubação com CTC e dura entre cinco e vinte minutos, devendo o tempo apropriado de incubação também ser verificado em experimentos preparatórios. As células marcadas com DAPI e com CTC podem ser visualizadas simultaneamente na mesma amostra, pois as células marcadas com CTC fluorescem em cor vermelha, e aquelas marcadas com DAPI fluorescem em cor amarela ou verde-claro.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- HERNANDEZ, M.; MILLER, S. L.; LANDFEAR, D. W.; MACHER, J. M. A combined fluorochrome method for quantitation of metabolically active and inactive airborne bacteria. **Aerosol Science and Technology**, v.30, p.145-160, 1999.
- KAWAI, M.; YAMAGUCHI, N.; NASU, M. Rapid enumeration of physiologically active bacteria in purified water used in the pharmaceutical manufacturing process. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, p.496-504, 1999.
- MARSH, P.; MORRIS, N. Z.; WELLINGTON, E. M. H. Quantitative molecular detection of *Salmonella typhimurium* in soil and demonstration of persistence of an active but non-culturable population. **FEMS Microbiology and Ecology**, v.27, p.351-363, 1998.
- RODRIGUEZ, G. G.; PHIPPS, D.; ISHIGURO, K.; RIDGWAY, H. F. Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.1801-1808, 1992.
- SCHAULE, G.; FLEMMING H.-C.; RIDGWAY, H. F. Use of 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride for quantifying planktonic and sessile respiring bacteria in drinking water. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.3850-3857, 1993.
- SMITH, J. J.; MCFETHERS, G. A. Mechanisms of INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride), and CTC (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride) reduction in *Escherichia coli* K-12. **Journal of Microbiological Methods**, v.29, p.161-175, 1997.
- THOLOZAN, J. L.; CAPPELIER, J. M.; TISSIER, J. P.; DELATTRE, G.; FEDERIGHI, M. Physiological characterization of viable-but-nonculturable *Campylobacter jejuni* cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.1110-1116, 1999.
- THOM, S. M.; HOROBIN, R. W.; SEIDLER, E.; BARER, M. R. Factors affecting the selection and use of tetrazolium salts as cytochemical indicators of microbial viability and activity. **Journal of Applied Bacteriology**, v.74, p.433-443, 1993.
- ULLRICH, S.; KARRASCH, B.; HOPPE, H.-G.; JESKULKE, K.; MEHRENS, M. Toxic effects on bacterial metabolism of the redox dye 5-cyano-2,3-ditoluyl tetrazolium chloride. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.4587-4593, 1996.
- WINDING, A.; BINNERUP, S. J.; SØRENSEN, J. Viability of indigenous soil bacteria assayed by respiratory activity and growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.2869-2875, 1994.
- YU, W.; DODDS, W. K.; BANKS, M. K.; SKALSKY, J.; STRAUSS, E. A. Optimal staining and sample storage time for direct microscopic enumeration of total and active bacteria in soil with two fluorescent dyes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.3367-3372, 1995.

# **XV. ESTIMATIVA DA ATIVIDADE MICROBIANA: MÉTODO DE HIDRÓLISE DO DIACETATO DE FLUORESCÉINA**

Regina Teresa Rosim Monteiro

## **Introdução**

Compostos fluorogênicos são enzimaticamente transformados em produtos fluorescentes que podem ser visualizados em microscópio de fluorescência. A fluoresceína é um exemplo desse grupo de compostos. Os derivados de fluoresceína são hidrolisados pelas lipases, esterases e parcialmente, pelas proteases. A reação pode ser catalisada pelas próprias células ou pelas enzimas extracelulares. Os microrganismos, algas, protozoários e tecidos animais estão habilitados a catalisar esta reação. Os ésteres de fluoresceína são compostos não-polares e podem facilmente ser transportados pelas membranas de células vivas. Em contraste, os produtos fluorescentes são polares e permanecem dentro das células. Por isso, o método

pode ser usado para detectar células microbianas ativas em cultura pura ou no solo, mas nunca os esporos ou células na fase estacionária do seu crescimento.

Schnürer and Rosswall (1982) utilizaram a hidrólise de diacetato de fluoresceína (3,6-diacetil-fluoresceína) (FDA) para estimar atividade microbiana na palha e no solo. Ghini et al. (1997) utilizaram com sucesso o método descrito por Chen et al. (1988) em amostras de solo brasileiro.

O método se baseia em estimar a fluoresceína produzida no solo tratado com solução de diacetato de fluoresceína e incubado a 24°C. Utilizar amostras de solo recém-coletadas. Antes de se iniciar o experimento deve-se conhecer o valor do peso seco.

## **Protocolo de análise** (Chen et al., 1988)

### **Materiais**

Espectrofotômetro – luz visível 490nm

Agitador – 150rpm com temperatura ajustada à 24°C

Centrífuga – a 4000 rpm ou filtrar em discos de papel de filtro (whatman nº 1 ou equivalente) com 12,5cm de diâmetro

Banho de gelo

Balança analítica

Banho-maria para fervura a 100°C

Luvas de látex descartáveis

Frascos de 125mL de capacidade

Tubos de ensaio 20mL com tampa de rosca

Tubos de ensaio 20ml

Amostras de solo recém coletadas com peso seco e capacidade de campo determinados.

## Reagentes

Tampão fosfato de sódio 60mM, pH 7.6 - (8,7g de  $K_2HPO_4$  + 1,3 g  $KH_2PO_4$  em 1L de água, ajustar o pH com HCl)

Acetona P.A.

Diacetato de fluoresceína (solução 2mg/mL em acetona): estocar a  $-20^{\circ}C$ .

Amostras de 5g de solo (peso seco) recém-coletado, passadas em peneira de malha 2mm, são distribuídas em Erlenmeyer de 125mL, em cinco repetições. Acrescentam-se 20mL de tampão fosfato e adiciona-se finalmente a solução de diacetato de fluoresceína (concentração final de  $2mg \mu L^{-1}$  – 200 $\mu L$  da solução). Fechar os frascos com folha de alumínio. A mistura é incubada em agitador a 150rpm a  $24^{\circ}C$ , por 20min. Após esse período de incubação, a reação é interrompida pela adição de acetona (20mL). A suspensão de solo é centrifugada a 4000rpm por 10 minutos, ou filtrada, tomando-se alíquotas do sobrenadante para análise em espectrofotômetro a 490nm.

Preparar uma curva de calibração para cada tipo de solo ensaiado, manuseando junto com as amostras.

### Curva de calibração e cálculos

Prepara-se curva de calibração exatamente como descrito acima, de tal modo que a relação entre a concentração de fluoresceína e a densidade óptica seja linear. Os resultados são expressos em  $\mu g$  de fluoresceína/g peso seco/hora ou  $\mu g$  FDA hidrolisado por 5g de solo.

Para cada amostra de solo a ser ensaiada, fazer a curva de calibração nas concentrações de 0, 100, 200, 300, 400 $\mu g$  FDA, previamente hidrolisados por calor. Para isto colocar 5mL de tampão fosfato em tubos de ensaio com rosca, adicionar a solução de FDA nas concentrações acima (adicionar 0, 50, 100, 150, 200 $\mu L$ , respectivamente da solução  $2mg mL^{-1}$ ). Tampar os tubos hermeticamente, ferver em ebulição por 5min em banho-maria e deixar

esfriar. Pesar 5g de amostra, do mesmo solo, em 2 repetições para cada concentração em Erlenmeyer, juntar as diferentes concentrações de FDA e adicionar mais 15mL de tampão fosfato. Agitar, por 20 min, procedendo como nas amostras.

A atividade das amostras será determinada diretamente na curva ou pela equação da curva-padrão.

Obs.:

1. A hidrólise de FDA no solo é linear em relação ao tempo e solo, até 3 horas, mas depende da temperatura ambiente.
2. Alguns componentes do solo extraídos no processo podem interferir na medida colorimétrica.
4. A hidrólise de FDA decresce com a profundidade do solo e está correlacionada com a respiração do solo.
5. A hidrólise de FDA é completamente inibida após esterilização pelo calor.
6. Tanto FDA quanto fluoresceína podem ser adsorvidos nas matérias orgânicas e minerais do solo.
7. Tomar todo cuidado no manuseio de FDA, devido a sua toxidez.

Exemplo de curva-padrão:

FDA ( $\mu\text{g}$ )	Absorbância 490nm
0	0,6415
100	1,3910
200	1,6175
300	2,1615
400	2,5960

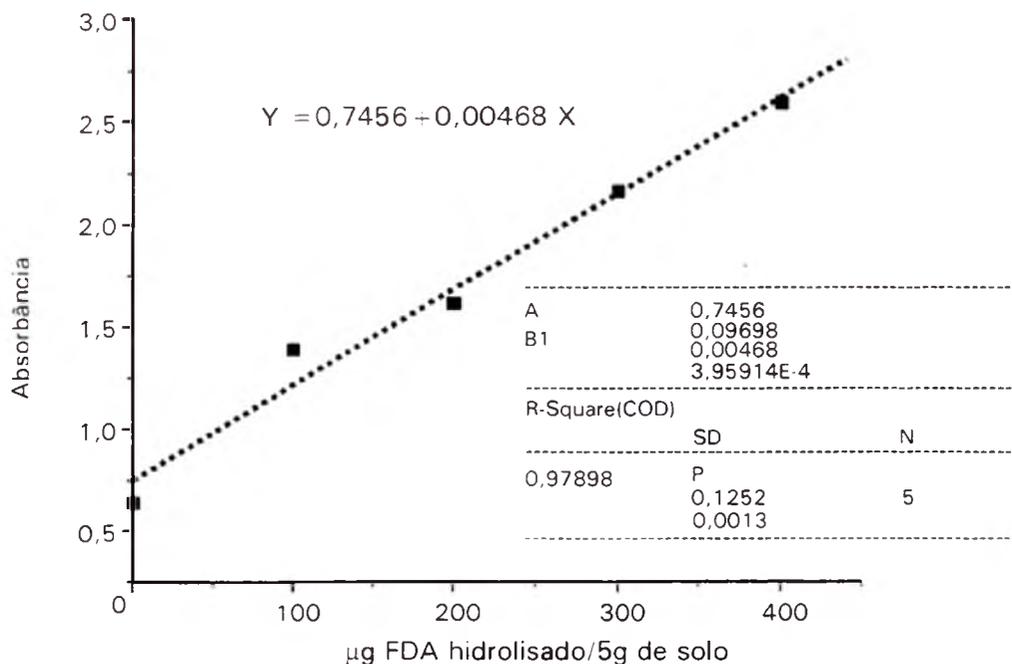


Figura 1. Curva-padrão em solo plantio direto

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHEN, W.; HOITINK, A.J.; SCHMITTHENNER, A.F.; TUOVINEN, O. H. The role of microbial activity in supression of damping-off caused by *Pythium ultimum*. **Phytophatology**, v.78, p.314-322, 1988.
- GHINI, R.; LIGO, M.A.; HERMES, L.C. Efeito de herbicidas na biomassa microbiana de solos de arroz irrigado. **Ecosistema**, v.22, p.97-101, 1997.
- SCHNÜRER, J.; ROSSWALL, T. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. **Applied and Environmental Microbiology**, v.43, p.1256-1261,1982.



# **XVI. ESTIMATIVA DA ATIVIDADE MICROBIANA DO SOLO POR CROMATOGRAFIA GASOSA**

Arquimedes Lavorenti

Nelson Frighetto

## **Introdução**

A avaliação da atividade microbiana de um solo está relacionada com a grandeza de sua biomassa microbiana, ou seja, com a quantidade de matéria microbiana. Existem vários métodos que possibilitam estimar a biomassa microbiana, mas nenhum deles reflete a situação real da atividade de todos os microrganismos presentes em um determinado solo. Uma maneira pela qual isto pode ser feito é medindo a quantidade de oxigênio consumido ou de dióxido de carbono liberado por uma amostra de solo em um determinado período de tempo (Jackson & Raw, 1966).

A biotransformação, também denominada de biodecomposição ou biodegradação, propiciada pela biomassa microbiana no solo, é um dos

processos mais importantes que podem atuar sobre os compostos orgânicos (como os pesticidas, por exemplo) presentes no ambiente. Este processo de decomposição ou de transformação, por sua vez, está intimamente relacionado às estimativas da biomassa da população microbiana presente no solo (Grisi, 1984).

Por outro lado, a atividade microbiológica total pode ser considerada como um índice adequado para definir a fertilidade do solo, considerando-se que o manejo do solo influencia o teor de sua biomassa, afetando, assim, a atividade enzimática (Gianfreda & Bollag, 1996).

Para se estimar esta atividade nos solos, Alef & Kleiner (1989) propuseram o monitoramento da redução de dimetilsulfóxido (DMSO) para dimetilsulfeto (DMS). Esta técnica tem demonstrado ser particularmente sensível e boa indicadora da atividade microbiológica e, conseqüentemente, da biomassa presente no solo. Através da técnica cromatográfica, o DMS é detectado rápida e quantitativamente, mesmo em baixas concentrações (Sparling & Searle, 1993). Esta reação baseia-se na seguinte equação:



Por ser o DMS insolúvel em água (e solúvel em solventes orgânicos), ele dilui-se na fase gasosa (headspace), podendo, desta forma, ser analisado quantitativamente. A velocidade de liberação do DMS é constante por diversas horas. A linearidade do gráfico: DMS (ng g<sup>-1</sup> de amostra) vs. tempo (h) mostra que nem o número de microrganismos presentes, nem seu estado fisiológico se alteram no decorrer do ensaio.

Esta reação é catalisada supostamente por vários tipos de enzimas, dentre as quais são citadas a sulfóxido metionina redutase (Wood, 1981; Gibson, 1985), sulfóxido biotina redutase (Zinder, 1978b), enzima que catalisa a redução da proteína ligada ao sulfóxido metionina (Zinder, 1978a), etc. A redução de DMSO é catalisada por vários tipos de microrganismos encontrados

no solo. De 144 linhagens de fungos e bactérias já estudados e testados, somente 5 linhagens (quais sejam *Bacillus sphaericus*, *Pseudomonas indigofera*, *P. saccharophila*, *Penicillium nalgiovensis* e *P. roquefortii*), totalizando 3,5%, se mostraram incapazes de reduzir o DMSO em DMS (Alef & Kleiner, 1989). O tolueno, cianetos, azidas ( $\text{NaN}_3$ ) e agentes fumigantes (por exemplo, o brometo de metila), bem como alguns íons metálicos, mormente de metais pesados, como Cr-VI e As-V foram testados como inibidores da referida reação. Sabe-se, porém, que a glucose estimula e promove consideravelmente esta reação (Alef & Kleiner, 1989).

## Protocolo de análise Alef & Kleiner (1989)

### Etapas básicas para a redução de DMSO

- Adicionar 10 gramas de solo em um frasco semelhante ao Erlenmeyer de 50mL (frascos de redução de DMSO com tampas de borracha);
- Deixar pré-incubado a 40°C (banho-maria) por 10 minutos com a tampa do frasco meio solta;
- Adicionar 1,5mL de solução de DMSO a 10% na amostra de solo e fechar bem forte a tampa;
- Deixar incubando a 40°C (banho-maria) por 3 horas;
- Remover o frasco do banho-maria e, através de uma seringa cromatográfica, retirar uma alíquota de 250mL da fase gasosa de DMS formada no espaço livre do frasco e injetar no cromatógrafo;
- Secar a amostra de solo na estufa e pesar.

### Condições de operação do cromatógrafo

Taxa de fluxo de  $\text{H}_2 = 30\text{mL min}^{-1}$

Taxa de fluxo de He =  $30\text{mL min}^{-1}$

Detector = FID ( Flame Ionization Detector)

Coluna = Porapak R (2m)

Programação da temperatura: Temperatura inicial do forno = 70°C

Tempo inicial = 0,20min

Taxa de elevação = 30 graus min<sup>-1</sup>

Temperatura final = 160°C

Tempo final = 3,20min

Temperatura do injetor = 250°C

Temperatura do detector = 300°C

Tempo de equilíbrio = 1,00min

### Etapas básicas para a curva-padrão de DMS

- Transferir uma alíquota de 100µL de padrão de DMS para um frasco especial de 100mL com tampa de borracha, tomando a precaução de fechar bem forte a tampa (Padrão 1).
- Transferir uma alíquota de 250µL da fase gasosa do Padrão 1 para outro frasco de 100mL, fechando bem forte também este frasco (Padrão 2). Isto é feito com seringa cromatográfica.

### Cálculos

DMS (d = 0,85kg L<sup>-1</sup>)

$$\begin{array}{rcl} 850 \text{ g DMS} & \rightarrow & 1.000.000\mu\text{L} \\ x & \leftarrow & 100\mu\text{L (volume da alíquota do padrão)} \end{array}$$

$$x = 85\text{mg DMS (Padrão 1)}$$

$$\begin{array}{rcl} 85 \text{ mg DMS} & \rightarrow & 132.000 \mu\text{L (volume de gás no frasco de 100mL, valor variável)} \\ y & \leftarrow & 250\mu\text{L (volume da alíquota do padrão 1)} \end{array}$$

$$y = 160,98\mu\text{g DMS (Padrão 2)}$$

160,98  $\mu\text{g DMS}$   $\rightarrow$  132.000 $\mu\text{L}$  (volume de gás no 2º frasco de 100mL)  
 Conc. DMS  $\leftarrow$  1 $\mu\text{L}$  (volume de gás para definir o valor da concentração)

$$\text{Conc. DMS} = 0,00122 \mu\text{g DMS } \mu\text{L}^{-1}$$

São injetados no cromatógrafo volumes variados do padrão de DMS de modo a se obter uma curva-padrão de DMS. Abaixo estão alguns exemplos de resultados obtidos:

	Y	X
Volume injetado do Padrão 2 ( $\mu\text{L}$ )	DMS ( $\mu\text{g}$ )	Valor da área de integração no CG
10	0,0122	15452
20	0,0244	29485
30	0,0366	43752
40	0,0488	59103
50	0,0610	73667
60	0,0732	87793
70	0,0854	102157
80	0,0976	116349
90	0,1098	132143
100	0,1220	147590

Através dos resultados acima, é possível obter uma curva-padrão de DMS, que pode ser utilizada para calcular as concentrações de DMS presentes nas amostras em estudo. Do mesmo modo, uma equação da curva é obtida, e os resultados de DMS das amostras também são calculados:

$$Y = 0,000834 X - 0,22 \quad (r = 0,9999)$$

Todos os resultados são expressos em: ng DMS (g solo seco/hora)<sup>-1</sup>.

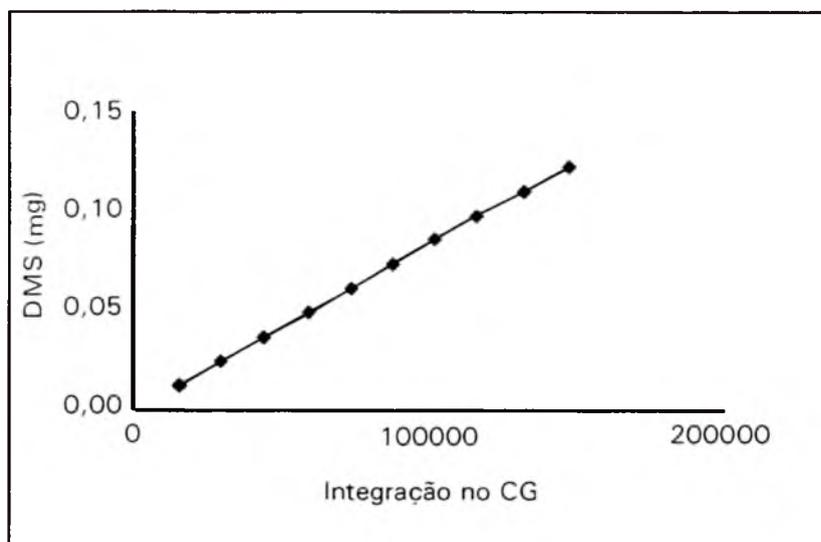


Figura 1. Curva-padrão de DMS através dos resultados anteriormente obtidos.

### **Aplicação prática e variação do método de Alef & Kleiner (1989)**

Os solos escolhidos para os estudos foram coletados na região de Guaíra, onde se praticam técnicas agrícolas de fronteira, como: irrigação através de pivôs centrais, práticas 100% mecanizadas e adubação inorgânica intensiva.

Para efeito de comparação, foi escolhida outra região com práticas agrícolas completamente antagônicas: agricultura orgânica com adubação e práticas culturais pertinentes, em região rodeada por matas nativas cujo solo também foi submetido a idêntico procedimento analítico.

As amostras colhidas foram passadas em peneira de 2mm e guardadas em geladeira a 4°C até o momento de serem analisadas.

Como metodologia de redução de DMSO em DMS, seguiram-se as prescrições feitas por Alef e Kleiner (1989), variando-se a temperatura de incubação para 30°C.

**Objetivo:** Através do presente trabalho pretendeu-se mostrar a versatilidade de uma técnica analítica potencialmente útil no estudo da atividade microbiana, em solos da mais variada composição, que primasse tanto na sensibilidade quanto na reprodutibilidade de seus resultados.

As amostras foram retiradas da geladeira e mantidas à temperatura ambiente por 24 horas. Pesou-se 0,5g de amostra de solo, em 4 replicatas, e colocou-se em frascos de 37,5mL, com a tampa levemente rosqueada, deixando-os em pré-incubação em banho-maria a 30°C por 10min. Acrescentou-se 0,6mL de solução aquosa 5,0% (v/v) de DMSO, fechando-se o frasco hermeticamente com septo de silicone faceado com Teflon e com anel de alumínio, mantendo-se incubado em banho-maria, à temperatura de 30°C por 3 (três) horas. Depois de 3 horas de incubação, retiraram-se alíquotas de 100µL de headspace através de seringa hipodérmica, especial para gases.

Injetou-se a amostra em cromatógrafo HP-5890, equipado com uma coluna de vidro de 2,1m de comprimento por 2mm de diâmetro interno, empacotada com a fase HayeSep R, (ou Porapack R), de 80 a 100 Mesh. O detetor utilizado foi o Detetor de Ionização de Chama (FID). O gás de arraste utilizado foi o Hélio, numa vazão de 13mL por minuto. A temperatura da coluna, do injetor e do detetor foi de 160 (isoterma), 200 e 220°C, respectivamente. O tempo de retenção do DMS nas condições analíticas acima descritas foi de 6min. Utilizou-se um integrador HP-3396A.

### **Procedimento utilizado para a preparação do padrão (\*)**

O padrão interno de DMS foi preparado a cada dia em que se processaram as análises. Para tanto, injetaram-se 12,0µL (10,16mg) de DMS padrão (líquido previamente mantido a 4°C, pureza mínima de 99,0%), num frasco de 35mL previamente fechado com septo de silicone faceado com Teflon e lacrado com anel de alumínio. Rapidamente, à temperatura ambiente, o DMS volatilizará, formando esta solução gasosa chamada "Padrão 1". O cálculo

da concentração de DMS na fase gasosa é feito de acordo com a equação dos gases:

$$PV = nRT$$

onde:

P = pressão atmosférica (atm)

V = volume (L)

R = constante de gases (0,0832 atm)

T = temperatura (°K)

N = número de moles

Em seguida, transferiram-se 100µL da fase gasosa do Padrão 1 para outro frasco de 8,8 mL, hermeticamente fechado com septo de silicone faceado com Teflon e lacrado com anel de alumínio, constituindo-se em Padrão 2. Deste padrão secundário retiraram-se e injetaram-se alíquotas de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100µL construindo-se uma curva-padrão µg de DMS vs. valor de integração das áreas. Os valores obtidos na análise de cada amostra do solo serão inseridos nesta curva.

O procedimento para uma perfeita eliminação de eventuais traços de DMS na seringa, especialmente na diluição do Padrão 1 para o Padrão 2, é deixá-la por um período de 30 minutos em estufa a 80°C.

(\*) Para o presente estudo, o padrão foi preparado colocando-se 12,0µL de DMS puro (99,0%) em frasco de 37,5mL, dispensando-se a diluição de padrão primário para secundário.

Utilizou-se a seguinte equação para os cálculos finais:

$$= \frac{\text{DMS (ug)} \cdot V}{t \cdot v \cdot dwt}$$

onde:

V = volume do gas no frasco de reação = volume do frasco em mL

v = volume (mL) injetado

t = tempo de incubação

dwt = peso seco correspondente a 1g de solo úmido

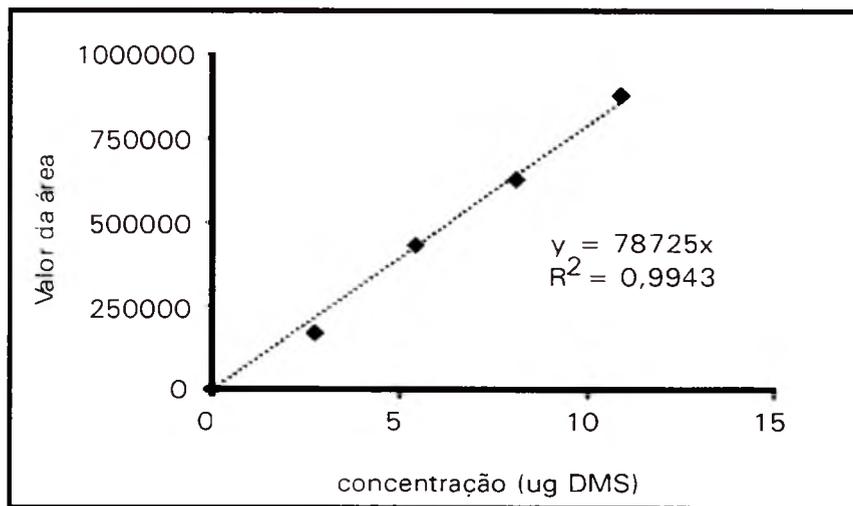


Figura 2. Curva-padrão de DMS utilizada para análise de amostras de solo

Amostra	Área/100uL	Conc. ugDMS	ugDMS/gsolo/hora	Segundo a eq.: $x = y/78725$
				<b>média</b>
C-1	14879	0,1890	11,088	12,80
C-2	21007	0,2668	15,655	
C-3	15644	0,1987	11,658	
A-1	90430	1,1487	67,389	65,42
A-2	91610	1,1637	68,269	
A-3	81340	1,0332	60,615	
M-1	150706	1,9143	112,308	117,31
M-2	152716	1,9399	113,806	
M-3	168833	2,1446	125,816	

## Resultados

### Principais conclusões obtidas que conferem com a referência original

Observou-se uma boa correlação, tanto entre a atividade microbiana e o teor de matéria orgânica, quanto da atividade microbiana com o tempo de reação e a quantidade de solo utilizada. Por outro lado, tanto o pH, quanto o teor de argila do solo não apresentaram variações significativas na correlação com a maior ou menor população microbiana no solo.

Ainda que outros métodos possam ser usados para estimar a biomassa microbiana e sua respectiva atividade no solo, as principais vantagens propiciadas por este método analítico são:

- a) a atividade pode ser medida em amostras muito pequenas de solo (<0,1g);
- b) o método analítico mostrou ser muito simples, rápido e de custo baixíssimo;
- c) pelo fato de o DMS ser insolúvel em água, pode-se determiná-lo quantitativamente na fase gasosa, evitando etapas de extrações.

### Algumas conclusões adicionais no estudo deste método (Alef & Kleiner, 1989):

- a) a granulometria do solo mostrou ser um parâmetro irrelevante quanto à ação redutiva do DMSO.
- b) o armazenamento dos solos a 4°C, por períodos de até 3 meses, não significou um declínio significativo na redução do DMSO. Quando, porém, as amostras de solo foram congeladas, houve um decréscimo inicial da ordem de 10 a 20% no tocante à redução do DMSO.

- c) os limites de detecção alcançados chegaram a 10ng de DMS por grama de solo, por hora de digestão, possibilitando avaliar atividade microbiana em quantidades muito pequenas de solo.
- d) a eventual presença de pequenas quantidades de raízes não afeta a análise de solo porque, embora a absorção de DMSO ocorra neste substrato, a redução de DMSO em DMS em raízes é muito pequena (<5%) (Smale et al., 1975).
- e) a constatação de que agentes oxidantes promovem uma diminuição na atividade redutora do DMSO sinalizam para um mecanismo não inteiramente biológico, porém ainda não está definitivamente esclarecido (Alef & Kleiner, 1989).
- f) havendo necessidade de aumentar a sensibilidade na determinação de DMS, pode-se utilizar um detetor fotométrico de chama (FPD) com um filtro para o Enxofre podendo-se determinar níveis de DMS de até  $10^{-12}$  mol.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEF, K.; KLEINER, D. Rapid and sensitive determination of microbial activity in soils and in soil aggregates by dimethylsulfoxide reduction. **Biology and Fertility of Soils**, v.8, p.349-355, 1989.
- GIANFREDA, L.; BOLLAG, J-M. Influence of natural and anthropogenic factors on enzyme activity in soil. **Soil Biochemistry**, v.9, p.123-193, 1996.
- GIBSON, R.M.; LARGE, P.J. The methionine sulphoxide reductase activity of the yeast dimethylsulphoxide reductase system. **FEMS Microbiology Letters**, v.26, p.95-99, 1985.
- GRISI, B.M. Metodologia da determinação de biomassa microbiana de solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.8, p.167-172, 1984.
- JACKSON, R.M.; RAW, F. Life in the soil. In: **Studies in Biology no. 2**. London: Edward Arnold, 1966. 60p.
- SMALE, B.C.; LASATER, M.J.; HUNTER, J.T. Fate and metabolism of DMSO in agricultural crops. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.243, p.228-236, 1975.

SPARLING, G.P.; SEARLE, P.L. Dimethyl sulphoxide reduction as a sensitive indicator of microbial activity in soil: The relationship with microbial biomass and mineralization of nitrogen and sulphur. **Soil Biology and Biochemistry**, v.25, n.2, p.251-256, 1993.

WOOD, P.P. The redox potential for dimethylsulphoxide reduction to dimethylsulfide. **FEBS Letters**, v.124, p.11-14, 1981.

ZINDER, S.H.; BROCK, T.D. (1987a). Dimethylsulphoxide reduction by microorganisms. **Journal of Genetics in Microbiology**, v.105, p.335-342, 1987a.

ZINDER, S.H.; BROCK, T.D. Dimethylsulphoxide as an electron acceptor for anaerobic growth. **Archives of Microbiology**, v.116, p.35-40, 1987b.

# **XVII. TEOR DE ERGOSTEROL PARA ESTIMAR A COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE FÚNGICA DO SOLO**

Rosa Toyoko Shiraishi Frighetto

## **Introdução**

Fungos desempenham um papel importante na decomposição de matéria orgânica, como celulose e lignina no solo. A quantificação da biomassa fúngica se restringe principalmente à contagem e método microscópico (Bååth et al. 1981; Parkinson 1982), cuja validade nas análises de solo, em condições de campo, vem sendo questionada. O ergosterol, que é um componente esteroidal das membranas fúngicas, foi demonstrado estar fortemente correlacionado com citoplasma vivo (Salmanowicz & Nylund, 1988; Martin et al., 1990; Nylund & Wallander, 1992). Ergosterol foi pela primeira vez usado como indicador sensível e confiável para se medir o crescimento fúngico por Seitz et al. (1977, 1979) em grãos de cereais. Subseqüentemente, foi utilizado para estimar a biomassa fúngica sobre materiais vegetais em decomposição (Lee et al. 1980; Newell et al., 1987, 1988; Gessner & Chauvet, 1993), no

solo (Grant & West, 1986; West et al. 1987; Zelles et al. 1987; Davis & Lamar, 1992; Hart & Brookes, 1996) e no ecto- e VA- micorrizas (Salmanowicz and Nylund, 1988; Johnson and McGill, 1990 a, 1990 b; Schmitz et al., 1991; Frey et al., 1992). O interesse pelo esteróide de origem fúngica cresceu ainda na década dos anos 60, com a descoberta de substâncias bloqueadoras de biossíntese do ergosterol, levando ao desenvolvimento de fungicidas com este modo de ação (Cremllyn, 1991).

## **Protocolo de análise** (Eash et al., 1996)

### **Materiais**

Banho-maria

Cuba com ultrasom

Agitador de tubos tipo "vortex"

Tubo de vidro tipo pyrex com tampa, capacidade 20 x 200mm

Funil de separação, capacidade 125mL

Funil de vidro de 5 cm de diâmetro

Balão de fundo redondo de 125mL

Tubo de vidro graduado de 10mL

Tubo de vidro graduado de 5mL

Seringa plástica de 3mL

Unidade filtrante HV millex em polietileno com membrana durapore 0,45µm de poro, 13µm, não-estéril, fêmea slip (Millipore ou Whatman).

### **Reagentes**

Metanol P.A., qualidade Carlo Erba ou similar

Hexano P.A., qualidade Nuclear ou similar

KOH P.A., qualidade Merck ou similar

Etanol 95% P.A., qualidade Merck ou similar

Solução de KOH P.A., 4% em etanol

Metanol grau HPLC, qualidade Mallinkrodt ou similar

Padrão de ergosterol, da Sigma.

Esta metodologia (Eash et al., 1996) é uma modificação do método adotado por Grant & West (1986), com a vantagem de utilizar menor quantidade de amostra e, em consequência, menos reagentes, onde se avalia o ergosterol total extraível em meio alcalino.

Pesar 5g de solo num tubo de ensaio, adicionar 15mL de metanol frio (0°C) e 5mL de solução etanólica de KOH (40g/L etanol 95%). Homogeneizar a mistura com misturador do tipo vortex, por alguns segundos, sonicar por 1 minuto em banho de ultrassom (frequência de 47Khz) e finalmente transferir para um tubo adequado a reações sob pressão. Manter os tubos em banho-maria a 85°C por 30 minutos (colocar teflon na borda do tubo antes de rosquear a tampa, para evitar a evaporação do metanol durante a hidrólise), sendo que aos 15 minutos submeter os tubos à agitação em agitador vortex. Esfriar e adicionar 5 mL de água deionizada. Filtrar a mistura sobre o papel de filtro Whatman nº 1 e lavar o papel com 5mL de metanol. Transferir o filtrado para um funil de separação e extrair com hexano (3 x 10mL). Remover a fase orgânica (superior) para um balão de fundo redondo e concentrar num evaporador rotativo a 43°C, até aproximadamente 2-3mL. Transferir a amostra para tubo graduado de 10mL e lavar o balão com mais 3 porções de 1mL. Evaporar a solução até a secura com auxílio de nitrogênio comercial. Ressuspender a amostra em 4 mL de metanol grau HPLC, homogeneizar em agitador vortex e filtrar através de filtro de 0.45mm (próprio para solventes orgânicos) para um tubo graduado de 5mL e acertar o volume com metanol grau HPLC. O volume do extrato pode, também, ser determinado baseando-se no seu peso.

### Quantificação

A quantificação do ergosterol é feita por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em coluna CLC-ODS 5µm (Shimadzu) ou similar; 0,46 x 25cm; a temperatura ambiente usando metanol como fase móvel, com fluxo de 0,8mL.min<sup>-1</sup>, detecção a 282nm em Shimadzu SPD-10AV, equipado com detetor uv-visível e *loop* de injeção de 50µL. Nestas condições, o tempo de

retenção do ergosterol será de aproximadamente 15 minutos. Utilizar solução 10ppm (e suas diluições) de ergosterol-padrão dissolvido em metanol para determinar a curva de calibração e o limite de detecção.

A curva-padrão deve ser obtida para cada testemunha (cada tipo de solo utilizado no experimento). A equação da reta assim obtida é utilizada para se encontrar a concentração do ergosterol na amostra.

**Obs.:** Lembrar que, para cada tipo de solo, é necessário quantificar a taxa de recuperação de ergosterol e, assim, definir as diluições que comporão a curva padrão. Para tanto, utilizar uma solução de concentração conhecida de ergosterol-padrão e aplicar ao solo em estudo e efetuar todas as etapas de extração e quantificação. Nos casos em que a concentração de ergosterol nas amostras for muito baixa, verificar se o loop de injeção instalado na bomba é adequado para garantir a qualidade do resultado de análise.

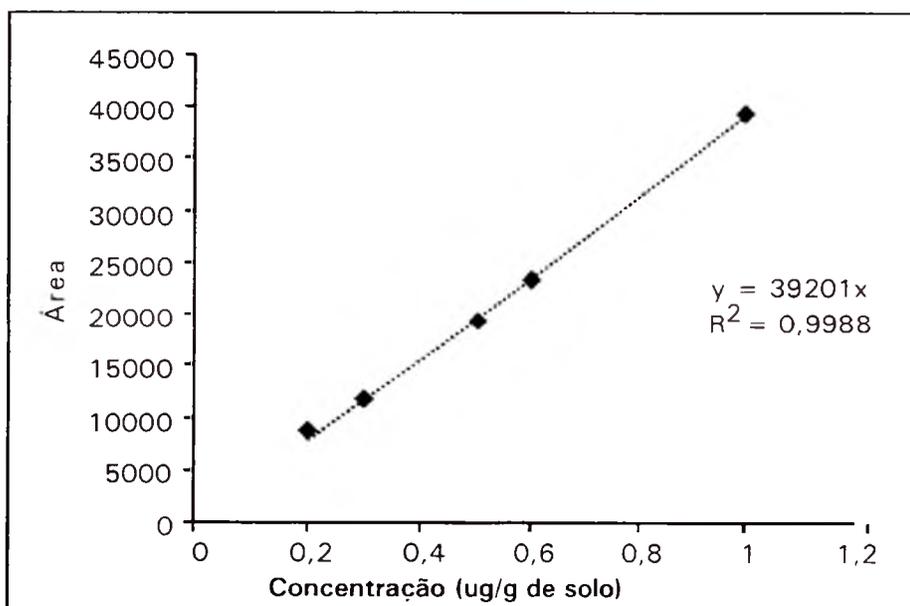


Figura 1. Curva-padrão de ergosterol em solo controle

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BÅÅTH E.; LUNDGREN, B.; SÖDERSTRÖM, B. Effects of nitrogen fertilization on the activity and biomass of fungi and bacteria in a podzolic soil. **Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene I Abteilung Originale C**, v.2, p.90-98, 1981.
- CREMLYN, R.J. **Agrochemicals**: preparation and mode of action. New York: John Wiley, 1991. 396p.
- DAVIS, M.W.; LAMAR, R.T. Evaluation of methods to extract ergosterol for quantitation of soil fungal biomass. **Soil Biology & Biochemistry**, v.24, p.189-198, 1992.
- EASH, N.S.; STAHL, P.D.; PARKIN, T.B.; KARLEN, D.L. A simplified method for extraction of ergosterol from soil. **Soil Science Society America Journal**, v.60, p.468-471, 1996.
- FREY, B.; BUSER, H.-R.; SSHÜEPP, H. Identification of ergosterol in vesicular-arbuscular mycorrhizae. **Biology and Fertility of Soils**, v.13, p.229-234, 1992.
- GESSNER, M.O.; CHAUVET, E. Ergosterol-to-biomass conversion factors for aquatic hyphomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.502-507, 1993.
- GRANT, W.D.; WEST, A.W. Measurement of ergosterol, diaminopimelic acid and glucosamine in soil: evaluation as indicators of microbial biomass. **Journal of Microbiological Methods**, v.6, p.47-53, 1986.
- HART, M.R.; BROOKES, P.C. Effects of two ergosterol-inhibiting fungicides on soil ergosterol and microbial biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, v.28, p.885-892, 1996.
- JOHNSON, B.N.; MCGILL, W.B. Comparison of ergosterol and chitin as quantitative estimates of mycorrhizal infection and *Pinus contorta* seedling response to inoculation. **Canadian Journal of Forestry Research**, v.20, p.1125-1131, 1990a.
- JOHNSON, B.N.; MCGILL, W.B. Variations in ergosterol content and ornithine decarboxylase activity of ectomycorrhizal root-soil systems. **Plant and Soil**, v.127, p.71-79, 1990b.
- LEE, C.; HOWARTH, R.W.; HOWES, B.L. Sterols in decomposing *Spartina alterniflora* and the use of ergosterol in estimating the contribution of fungi to detrital nitrogen. **Limnology and Oceanography**, v.25, p.290-303, 1980.
- MARTIN, F.; DELARUELLE, C.; HILBERT, J.L. An improved ergosterol assay to estimate fungal biomass in ectomycorrhizas. **Mycological Research**, v.94, p.1059-1064, 1990.
- NEWELL, S.Y.; ARSUFFI, T.L.; FALLON, R.D. Fundamental procedures for determining ergosterol content of decaying plant material by liquid chromatography. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.1876-1879, 1988.

- NEWELL, S.Y.; MILLER, J.D.; FALLON, R.D. Ergosterol content of salt-march fungi: effect of growth conditions and mycelial age. **Mycologia**, v.79, p.688-695, 1987.
- NYLUND, J.-E.; WALLANDER, H. Ergosterol analysis as a means of quantifying mycorrhizal biomass. In: NORRIS J.R.; D.J. READ, D.J.; VARMA, A .K., ed. **Methods in microbiology**: techniques for the study of mycorrhiza. London: Academic Press, 1992. p.77-88.
- PARKINSON, D. Filamentous fungi. In: PAGE A.L., MILLER R.H., KEENEY D.R., ed. **Methods of soil analysis**. Part 2. Chemical and microbiological properties. Madison: American Society of Agronomy, 1982. p.949-967.
- SALMANOWICZ, B.; NYLUND, J.-E. High performance liquid chromatography determination of ergosterol as a measure of ectomycorrhizal infection in Scots pine. **European Journal of Forest Pathology**, v. 18, p.291-298, 1988.
- SCHMITZ, O.; DANNEBERG, G.; HUNDESHAGEN, B.; KLINGER, A.; BOTHE, H. Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhiza by biochemical parameters. **Journal of Plant Physiology**, v.139, p.106-114, 1991.
- SEITZ, L.M.; MOHR H.E.; BURROUGHS, R.; SAUER, D.B. Ergosterol as indicator of fungal invasion in grains. **Cereal Chemistry**, v.54, p.1207-1217, 1977.
- SEITZ, L.M.; SAUER, D.B.; BURROUGHS, R.; MOHR, H.E.; HUBBARD, J.D. Ergosterol as a measure of fungal growth. **Phytopathology**, v.69, p.1202-1203, 1979.
- WEST, A.W.; GRANT, W.D.; SPARLING, G.P. Use of ergosterol, diaminopimelic acid and glucosamine contents of soils to monitor changes in microbial populations. **Soil Biology and Biochemistry**, v.19, p.607-612, 1987.
- ZELLES, L.; HUND, K.; STEPPER, K. Methoden zur relativen quantifizierung der pilzlichen biomasse im boden. **Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde**, v. 150, p.249-252, 1987.

# **XVIII. ANÁLISE DA BIOMASSA MICROBIANA EM CARBONO: MÉTODO DE FUMIGAÇÃO- EXTRAÇÃO**

Rosa Toyoko Shiraishi Frighetto

## **Introdução**

Dentre os nutrientes imprescindíveis aos microrganismos destacam-se o carbono, na forma de aminoácidos, ácidos graxos e açúcares, e o nitrogênio, como amônia e nitratos, que são absorvidos pelos microrganismos decompositores e o nitrogênio molecular atmosférico pelos fixadores deste elemento (Piccolo, 1996), ver Tabela abaixo (Manahan, 1994).

A avaliação da biomassa é útil para:

- obter informações rápidas sobre mudanças nas propriedades orgânicas do solo;

- detectar mudanças causadas por cultivos ou por devastação de florestas;
- medir regeneração dos solos após a remoção da camada superficial;
- avaliar os efeitos dos poluentes como metais pesados e pesticidas.

Além disso, a biomassa reflete a dinâmica da decomposição da matéria orgânica, influenciando na disponibilidade de nutrientes para as plantas e alterando as propriedades físicas do solo. O conhecimento sobre a biomassa microbiana é mais útil quando combinado com outros componentes do solo, como os estudos sobre interação trófica, funcionamento dos ecossistemas, atividades do solo e produtividade primária, ou mesmo em conjunto com avaliações sobre estresses e alterações ecológicas (Siqueira, 1994).

Por fim, pode-se dizer que a biomassa varia consideravelmente em termos temporais e espaciais determinados por fatores abióticos e bióticos. O desafio para o futuro será determinar as conseqüências diretas dessas variações nos ecossistemas e na produtividade dos sistemas agrícolas auto-sustentáveis.

## **Protocolo de análise**

### **Método de fumigação-extração (Vance et al., 1987)**

Esta metodologia analisa a biomassa microbiana extraível em solução aquosa de sulfato de potássio a 0,5 molar. A fumigação do solo com o clorofórmio, além de matar, rompe as células microbianas liberando o constituinte microbiano, principalmente no citoplasma, para o solo e permitindo-se assim sua extração (Powlson & Jenkinson, 1976).

### **Reagentes**

Clorofórmio P.A.

Sulfato de potássio P.A. ( $K_2SO_4$ ) a 0,5 molar

Dicromato de potássio P.A. ( $K_2Cr_2O_7$ ) a 0,0667 molar

Ácido sulfúrico P.A. a 0,4 molar

Sulfato ferroso amoniacal hexahidratado  $[(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}]$  a 0,0333 molar

Ácido fosfórico P.A., concentrado

O-fenantrolina

Sulfato ferroso heptahidratado

## Materiais

Bureta de 50mL

Erlenmeyer de 125mL

Funil de filtração

Funil de separação

Papel de filtro Whatman nº 42

Proveta

Tabela 1. Principais classes de compostos orgânicos no solo (Manahan, 1994)

Tipo de compostos	Composição	Significado
Humus	Resíduos de plantas resistentes a degradação, principalmente C, H e O	Componente orgânico mais abundante, melhora propriedades físicas do solo, troca nutrientes, reservatório de N fixo.
Ácidos graxos, resinas e ceras	Lipídeos extraíveis por solventes orgânicos	Em geral, uma pequena porcentagem da matéria orgânica do solo pode, desfavoravelmente, afetar as propriedades físicas pela sua característica hidrofóbica e vir a ser fitotóxica
Sacarídeos	Celulose, amidos, hemicelulose, gomas	Principal fonte de alimento para os microrganismos do solo, auxilia na estabilização dos agregados do solo
Moléculas contendo N	Nitrogênio ligado ao humus, aminoácidos, aminoaçúcares, outros compostos	Produz nitrogênio para fertilidade do solo
Compostos com fósforo (P)	Ésteres de fosfato, fosfatos de inositol (ácido fítico), fosfolipídeos	Fontes de fosfato a plantas

### Preparo das soluções

1.  $K_2SO_4$  a 0,5 molar: pesar 174g de  $K_2SO_4$  P.A. (grau Merck ou similar) e dissolver em 2 litros de água destilada.

$$M = \frac{m}{\text{Mol} \times V(L)} \Rightarrow 0,5 = \frac{m}{174 \times 2} = 174g$$

2. Clorofórmio livre de etanol: preparar solução aquosa de ác. sulfúrico 5%, diluindo-se 50mL de ácido concentrado em 1 litro de água destilada. O clorofórmio, normalmente, se encontra estabilizado com pequena quantidade de etanol e a presença deste poderá interferir no processo de fumigação.

Lavar o clorofórmio (3 vezes) com a solução ácida de ácido sulfúrico (para cada 250mL de clorofórmio usar 30mL de solução ácida). Esse procedimento é feito em funil de separação, descartando-se a fase aquosa (fase superior) a cada lavagem. Em seguida lavar (5 vezes) com 30mL de água destilada, descartando-se a fase aquosa. Adicionar carbonato de potássio, esperar cerca de 30 minutos e filtrar sobre papel de filtro comum. Acondicionar o clorofórmio sobre carbonato de potássio, em frasco escuro.

3.  $K_2Cr_2O_7$  0,0667 molar (66,7mM): pesar 1,9616g de dicromato de potássio P.A. e dissolver em 100mL de água destilada, em balão volumétrico.

$$M = \frac{m_1}{\text{Mol} \times V(L)} \Rightarrow 0,0667 = \frac{m_1}{294,11 \times 0,1} \Rightarrow m_1 = 1,9616 g$$

4.  $H_2SO_4$  0,4 molar: diluir 22,3mL de ác. concentrado em 1 litro de água destilada, em balão volumétrico.

***Cuidado: adicionar, sempre, ácido sobre a água***

$$M = \frac{m_1}{\text{Mol} \times V(\text{L})} \Rightarrow 0,4 = \frac{m_1}{98,02 \times 1} \Rightarrow 39,21\text{g}$$

$$d = \frac{m}{V} \Rightarrow 1,835 = \frac{39,21}{V} \Rightarrow V = \frac{39,21}{1,835} \Rightarrow 21,4\text{mL}$$

$$21,4 \text{ ————— } 96\%$$

$$X \text{ ————— } 100\% \quad X = 22,3\text{mL}$$

5.  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  33,3mM: pesar 13,0536g de sulfato ferroso amoniacal PA e dissolver em 1 litro de solução de ác. sulfúrico a 0,4 molar, em balão volumétrico.

$$M = \frac{m_1}{\text{Mol} \times V(\text{L})} \Rightarrow 0,0333 = \frac{m_1}{392 \times 1} \Rightarrow 13,0536\text{g}$$

6.  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$  (2:1): medir 150mL de ácido fosfórico concentrado, em uma proveta e 300mL de ácido sulfúrico concentrado, em uma outra proveta, obtendo-se uma mistura total de 450mL.

OBS: o ác. fosfórico deve ser adicionado sempre antes do ác. sulfúrico.

7. Indicador Ferroina: pesar 1,485g de O-fenantrolina monohidratada, 0,695g de sulfato ferroso heptahidratado e, num balão volumétrico, dissolver em 100mL de água destilada.

### **Padronização de Sulfato Ferroso Amoniacal 0,0333 molar**

Pipetar 3mL de solução de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  a 0,0667 molar em um erlenmeyer de 125mL, 50mL de água destilada, 15mL de ác. sulfúrico concentrado e 4

gotas de indicador ferroina. Procedese a titulação com sulfato ferroso amoniacal, utilizando-se bureta de 50mL.

Determina-se o ponto final quando a solução passar de verde para vermelho.

$$NR = \frac{V \text{ mL de } K_2Cr_2O_7 \times \text{Molaridade } H_2SO_4}{V \text{ mL de } (NH_4)_2Fe(SO_4) \times 6H_2O}$$

$$V_1 = 35,6\text{mL}$$

$$V_2 = 35,7\text{mL} \quad \text{média} = 35,65\text{mL}$$

$$NR = \frac{3 \times 0,4}{35,65} \Rightarrow NR = 0,0337 \text{ (normalidade real)}$$

$$fc = \frac{NR}{NT} \Rightarrow \frac{0,0337}{0,0333} \Rightarrow 1,012 \text{ (fator de correção)}$$

### **Extração de solos com $K_2SO_4$ a 0,5 Molar**

Ao pesar o solo, acrescenta-se a umidade nele encontrada, procedendo-se da seguinte maneira, considerando que a umidade encontrada foi de 5,59%, temos:

$$25 + \frac{5,59 \times 25g}{100} = 26,40g$$

Neste caso, pesar 26,40g de solo ao invés de 25g descrito no método.

### **Fumigação do solo**

Pesar 25g de solo, acrescido da quantidade relativa à umidade, em um béquer de 100mL e colocar num dessecador forrado com papel de filtro umedecido com água destilada. No centro do dessecador colocar um béquer

contendo cerca de 25mL de clorofórmio lavado (livre de etanol), para fumigação. Fazer vácuo por alguns minutos e deixar no escuro por 24h.

Após esse período, evacuar todo o vapor de clorofórmio, fazendo-se sucessivamente vácuo e entrada de ar, por aproximadamente 6 vezes, sempre dentro de uma capela com exaustão. Transferir os solos contidos nos béqueres para frascos plásticos com tampa rosqueável, adicionar 100mL de solução aquosa de  $K_2SO_4$  a 0,5 molar. Agitar por 30 minutos em mesa orbital, deixar decantar e filtrar o sobrenadante sobre papel de filtro Whatman nº 42. O extrato pode ser armazenado em geladeira até sua utilização para análise (nunca além de duas semanas).

### **Solo Não-Fumigado**

Pesar 25g de solo, acrescido de quantidade relativa à umidade, em béquer de 100mL e proceder diretamente à extração com solução aquosa de  $K_2SO_4$  a 0,5 molar agitando-se por cerca de 30 minutos em agitador de mesa orbital, deixar decantar e filtrar o sobrenadante. O extrato pode ser armazenado em geladeira até a sua análise.

- Obs.:** a. Para obter uma melhor separação do sobrenadante, pode-se usar uma centrífuga.
- b. Se o solo é muito rico em MO, aumentar a proporção entre o solo e o extrator.

**Biomassa microbiana em carbono pelo método de oxidação com dicromato** (Anderson & Ingram, 1993).

Na presença de ácido forte, a matéria orgânica é oxidada e o crômio (+ VI) é reduzido ao crômio (+ III). O dicromato remanescente é quantificado por titulação.

- Pipetar 8mL de extrato do solo e transferir para um tubo digestor.

- Acrescentar 2mL de dicromato de potássio 66,7mM e 15mL de ácido sulfúrico/fosfórico (2:1).
- Efetuar a digestão ácida, colocando os tubos com pequenos funis nas bordas para proporcionar o refluxo, em bloco digestor por 30 minutos à 100°C.
- Após esse período, deixar esfriar e transferir o volume dos tubos para um Erlenmeyer de 125mL, lavar os tubos com porções de água destilada e completar o peso até 50 gramas com água destilada.

**Obs.:** Se o laboratório possuir proveta de 50mL calibrada e aferida, poderá utilizar esta, completando o volume até 50mL em vez de 50 gramas.

- Adicionar 7 gotas de indicador ferroína e titular com sulfato ferroso amoniacal padronizado utilizando bureta de 50mL.
- A solução inicial é verde e, à medida que se vai adicionando o titulante, ela passa a azul-claro e o ponto final é determinado pelo aparecimento da coloração vermelho-intenso.

**Obs.:** As alíquotas do extrato e das soluções são medidas com pipetas volumétricas.

**Cálculo da biomassa de carbono em solo** (Vance et al., 1987; Joergensen, 1996).

Fórmula usada para concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ):

$$= [(H-S)/C] \times [(M \times D/A) \times E \times 1000]$$

onde:

H = vol. (mL) branco quente

S = vol. (mL) sol. sulfato ferroso consumido pela amostra

C = vol.(mL) branco frio

M = molaridade do dicromato consumido

D = vol. (mL) do dicromato adicionado a mistura

A = vol. (mL) da alíquota do extrato

E = conversão de  $\text{Cr}^{+6}$  para  $\text{Cr}^{+3}$

Fórmula usada para concentração ( $\mu\text{g g solo}^{-1}$ ):

$$= C(\text{ug/ml}) \times [K/(DW + W)]$$

onde:

K = vol. de extração

DW = peso seco

W = % de água

Fórmula para cálculo da Biomassa em carbono ( $\mu\text{g g solo}^{-1}$ ):

$$= E_c(F-NF)/0.38$$

onde:

$E_c$  = a diferença entre a concentração em  $\mu\text{g g solo}^{-1}$  do Fumigado e do Não-fumigado

### Observações:

- Durante a estocagem da solução em geladeira, antes da análise, podem formar precipitados brancos de  $\text{Ca SO}_4$ , especialmente se a solução for armazenada em freezer. Nessa situação, não é necessário dissolver o precipitado, pois este não interfere no processo de análise.
- O teor da umidade no solo interfere na análise. Em solos muito secos, o clorofórmio afeta pouco os microrganismos. Inclusive, a atividade enzimática e, conseqüentemente, a *autólise* é mais lenta nesses solos (Sparling & West, 1989; Sparling et al., 1990).

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, J.M.; INGRAN, J.S.I., ED. **Tropical soil biology and fertility: a handbook of methods.** Wallingford: CAB International, 1993.
- JOERGENSEN, R.G. The fumigation-extraction method to estimate soil microbial biomass: calibration of the  $k_{ec}$  value. **Soil Biology and Biochemistry**, v.28, p.25-31, 1996.
- MANAHAN, S.E. The Geosphere and geochemistry. In: STANLEY E.; MANAHAN, S.E., ed. **Environmental chemistry**. 6.ed. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.433-458.
- PICCOLO, A. ed. **Humus substances in terrestrial ecosystems.** Amsterdam: Elsevier Science, 1996.
- POWLSON, D.S.; JENKINSON, D.S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. II. Gamma irradiation, autoclaving, air-drying and fumigation with chloroform or methyl bromide. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, p.179-188, 1976.
- SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.de S.; GRISI, B.M.; HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R.S., ed. **Microrganismos e processos biológicos do solo- perspectiva ambiental.** Brasília: Embrapa-SPI, 1994. p.40-41.
- SPARLING, G.P.; WEST, A.W. Importance of soil water content when estimating soil microbial C, N and P by the fumigation-extraction method. **Soil Biology and Biochemistry**, v.21, p.245-253, 1989.
- SPARLING, G.P.; FELTHAN, C.W.; Reynolds, J.; West, A.W.; Singleton, P. Estimation of soil microbial C by fumigation-extraction method: use on soils of high organic matter content, and a reassessment of the  $k_{ec}$ -factor. **Soil Biology and Biochemistry**, v.22, p.301-307, 1990.
- VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, v.19, p.703-707, 1987.

# **XIX. DETERMINAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DE ORIGEM MICROBIANA E SUA IMPORTÂNCIA NA ESTRUTURAÇÃO DO SOLO**

Rosa Toyoko Shiraishi Frighetto

## **Introdução**

Polissacarídeos extracelulares são enfatizados como sendo os constituintes de maior importância nas funções de microrganismos no solo, por desempenharem a função de interface entre os microrganismos e os constituintes do solo. Algumas das propriedades do solo que são afetadas pelos polissacarídeos são a capacidade de troca catiônica (atribuída aos grupos COOH de ácidos urônicos), retenção de ânions (devido à ocorrência de grupos NH<sub>2</sub>) e atividade biológica (por exemplo, a fonte de energia para os microrganismos). Os polissacarídeos são envolvidos na agregação de partículas do solo e na resistência dos microrganismos ao ciclo de seca e umidade e ao *stress* osmótico. Através de propriedades quelantes, os polissacarídeos podem

também ser envolvidos na resistência à toxicidade do Al e metais pesados e no processo de acumulação de metais na superfície celular (Robert & Chenu, 1992). Do ponto de vista ambiental, os polissacarídeos desempenham uma função importante. A retenção de poluentes orgânicos e metálicos que alcançam o solo por diversos caminhos podem ser influenciados por nível e tipo de polissacarídeos presentes. Além de sua participação no destino final desses poluentes, outra importância a ser destacada é no uso de resíduos orgânicos de efluentes como adubação. Se o tempo adequado não é obedecido entre as aplicações de efluentes, para que as condições aeróbias sejam reestabelecidas na superfície do solo, pode resultar no processo chamado de obstrução de poros. Este efeito foi atribuído ao acúmulo de polissacarídeos bacterianos, resultando na redução drástica da permeabilidade.

## **Significado de polissacarídeos no crescimento de plantas**

A estrutura do solo e, em particular, a estabilidade dos agregados, têm uma influência considerável no crescimento de plantas através de efeitos na aeração, infiltração e características de drenagem, e esta influência se estende também à emergência de plântula. É sabido que a área de pastagem permanente ou a adição de resíduos orgânicos no solo resultam na melhora da estrutura, envolvendo a formação de agregados com certo grau de estabilidade. O maior estímulo para o estudo de polissacarídeos no solo tem sido devido ao acúmulo de evidências de que estes participam do desenvolvimento de agregados estáveis. Além dos efeitos nas propriedades físicas do solo, têm influências mais ou menos indiretas na suplementação nutricional de plantas. A suplementação de cátions do grupo de macronutrientes é influenciada pela contribuição de polissacarídeos na capacidade de troca catiônica. No entanto, interações com micronutrientes e com ânions podem também ter grande significado. A formação de complexos solúveis com micronutrientes iônicos pode aumentar a disponibilidade destes últimos, dentro das faixas de pH onde estes seriam

normalmente precipitados. Do mesmo modo, a formação de complexos insolúveis pode reduzir sua disponibilidade. Vários efeitos de carboidratos no comportamento de fosfatos também foram observados. Os açúcares simples podem prevenir a precipitação de fosfatos pelo ferro e alumínio, dependendo do pH (Stevenson, 1982), e a impregnação dos polissacarídeos aos sesquióxidos ou partículas minerais pode diminuir a fixação de fosfato e também de borato. A presença de carboidratos rapidamente metabolizáveis no solo também tem um efeito profundo na transformação de nitrogênio e, sob condições favoráveis à atividade microbiana, pode contribuir para o aumento da imobilização microbiana de nitrogênio e, em algumas situações, estimulação da desnitrificação. Alternativamente, o estímulo ao rápido crescimento da população microbiana, tais materiais podem levar à degradação acelerada de frações húmicas mais estáveis levando, eventualmente, ao aumento de mineralização de nitrogênio. Monossacarídeos livres e polissacarídeos são, pelo menos parcialmente, responsáveis pelo efeito da rizosfera sobre esse processo. Webley et al. (1965) sugeriram que a pastagem pode proporcionar estruturação do solo, parcialmente, pela ação de polissacarídeos produzidos pela população do rizoplano, já que polissacarídeos extracelulares de origem bacteriana foram mais abundantes no rizoplano do que no solo longe da raiz.

## **Significado em relação aos problemas ambientais**

O conhecimento sobre o comportamento de polissacarídeos no solo é uma questão importante do ponto de vista ambiental. O comportamento de poluentes orgânicos e metálicos que alcançam o solo por diversos caminhos pode ser influenciado pelo nível e tipo de polissacarídeos presentes, pois a biodegradação de pesticidas orgânicos no solo está relacionada à atividade microbiana que, por sua vez, responde ao nível de substratos que apresetam taxa de decomposição rápida, como os carboidratos. Processo semelhante acontece com a velocidade de degradação de produtos de petróleo jogados no solo, sendo acelerada pela presença ou adição de materiais altamente

ricos em carboidratos, bem como de outras exigências para sustentar o alto nível de atividade microbiana (especialmente a aeração, pH e suplementação de nutriente).

Aplicações pesadas de dejetos animais, os quais são ricos em carboidratos, podem induzir no solo, por um certo período, condições altamente anaeróbias por ser a velocidade de consumo de oxigênio livre mais rápida do que a sua difusão pelas camadas superficiais do solo. O mesmo desequilíbrio pode também aparecer quando se usa inadequadamente o efluente de esgotos na adubação. Se o tempo adequado não é obedecido entre as aplicações do efluente, para que as condições aeróbias sejam restabelecidas na superfície do solo, pode resultar no fenômeno chamado de "entupimento de poros" (Stevenson, 1982). Esse efeito foi atribuído à situação induzida de acúmulo dos polissacarídeos bacterianos, o que leva à redução drástica da permeabilidade.

Pode-se concluir que carboidratos são os componentes majoritários da matéria orgânica do solo, tanto no seu estado natural como no estado modificado pela atividade humana. Eles exercem uma função importante sobre os aspectos físico, químico, biológico e indiretamente sobre o comportamento dos xenobióticos que alcançam o solo.

## **Protocolo de análise** Stevenson (1982) e Santanatoglia & Fernandez (1983).

### **Reagentes**

Hidróxido de sódio P.A., 0,5N

Ácido clorídrico P.A., concentrado

Acetona P.A., qualidade Merck ou similar

Ácido sulfúrico P.A., concentrado

Dicromato de potássio P.A., 1N

Ágar bacteriológico, qualidade Difco ou similar

## **Materiais**

Erlenmeyer de 125mL  
Tubos para centrífuga  
Agitador orbital de mesa  
Centrífuga  
Espectrofotômetro  
Papel de filtro comum

## **Procedimentos de análise**

Pesar 7,5g de solo em um Erlenmeyer de 125mL, adicionar 30mL de NaOH a 0,5N, fechar com filme de PVC e colocar em agitador orbital por 3h. Após esse período, retirar do agitador e acertar o pH do solo para 2.5 com ác. clorídrico concentrado. Transferir o conteúdo do erlenmeyer para um tubo de centrífuga e centrifugar por 5 minutos a 2400 rpm, para precipitar os ácidos húmicos .

Filtrar o sobrenadante em papel de filtro comum e adicionar a 20mL do filtrado 40mL de acetona. Deixar em repouso por cerca de duas horas e centrifugar a 2400rpm por 5 minutos. Descartar o sobrenadante, por decantação, e a cada tubo de centrífuga adicionar 5mL da solução água/acetona. Agitar vigorosamente em agitador de tubos e, após 10 minutos, centrifugar novamente por 10 minutos e decantar o sobrenadante.

Os tubos são colocados na estufa a 40°C por 10 minutos para eliminar acetona. Esfriar e adicionar a cada tubo 1mL de  $K_2Cr_2O_7$  1N e 2mL de ác. sulfúrico concentrado (método de oxidação com dicromato). Agitar, deixar em repouso e, após 20 minutos, acrescentar 5 mL de água destilada. Esfriar e fazer a leitura de absorbância em espectrofotômetro a 600nm (Figura 1) (Santanatoglia & Fernandez, 1983).

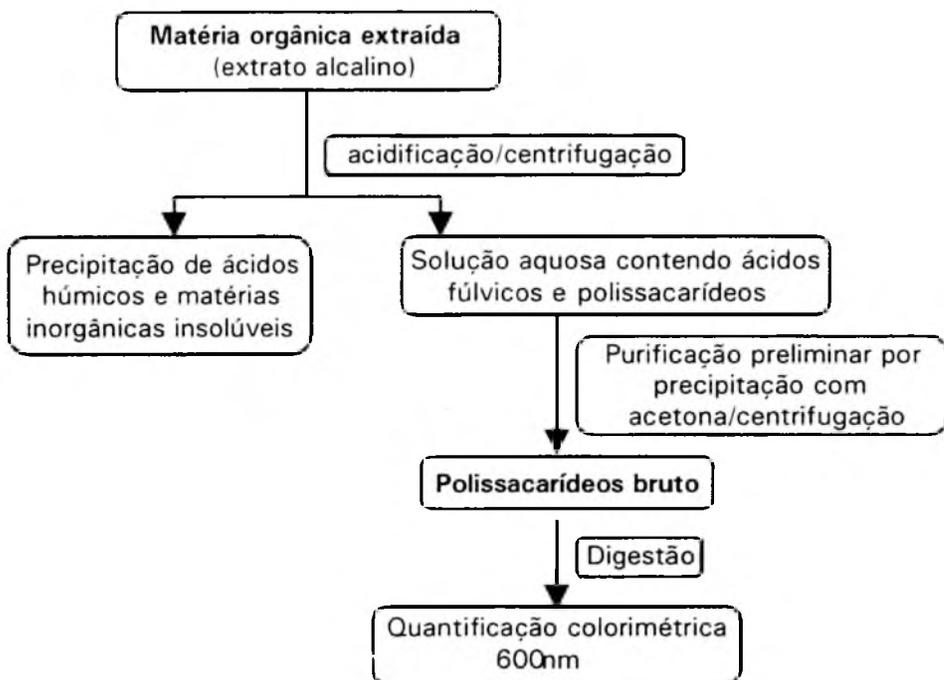


Figura 1. Fluxograma para recuperação de polissacarídeos a partir de extratos de solo.

### Curva-padrão de ágar

Preparar solução estoque de ágar na concentração de  $1\text{mg mL}^{-1}$ , em balão volumétrico. Para essa preparação, é necessário deixar a mistura em banho-maria a aproximadamente  $90^{\circ}\text{C}$  para assegurar total solubilização do ágar. Deixar esfriar até a temperatura ambiente e acertar o nível de água.

A partir da solução estoque de ágar, preparar a curva-padrão pipetando-se volumes de 1 a 9mL da solução-estoque, com pipetas volumétricas, para tubos de ensaios. Colocar os tubos na estufa a  $100^{\circ}\text{C}$ , de um dia para outro, para evaporar totalmente a água.

Esfriar e acrescentar 1mL de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  1N e 2mL de ác. sulfúrico concentrado. Após 20 minutos, acrescentar 5mL de água destilada e efetuar a leitura em espectrofotômetro a 600nm. Preparar o gráfico absorbância x concentração (Figura 2).

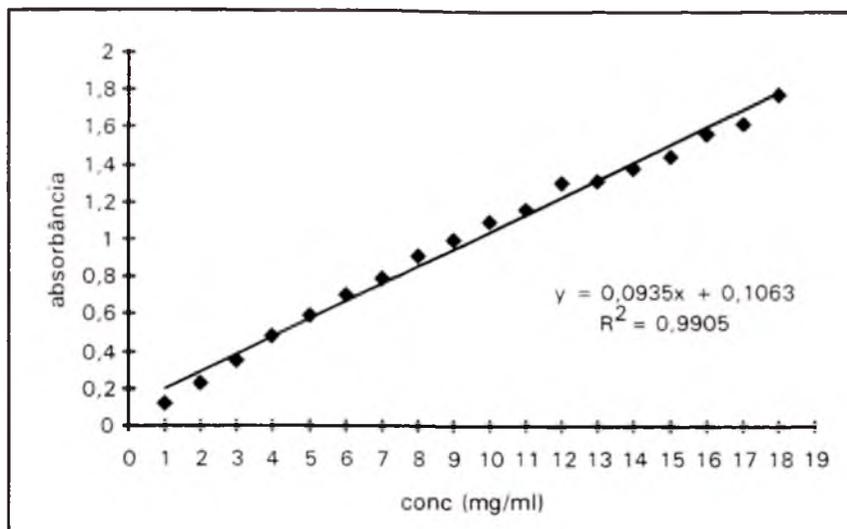


Figura 2. Curva-padrão de ágar utilizada na análise

Aplicando-se a equação da reta, resultante do gráfico anterior, obtém-se a concentração em cada uma das amostras.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ROBERT, M.; CHENU, C. Interactions between soil minerals and microorganisms. In: STOTZKY, G.; BOLLAG, J.-M., ed. **Soil biochemistry**. New York: Marcel Dekker, 1992. v.7, p.307-404.
- SANTANATOGLIA, O.J.; FERNANDEZ, N. Estabilidad estructural y contenido de gomas microbianas, bajo distintos tipos de manejo, en un suelo de la serie ramallo (argiudol vertico). **Ciencia del Suelo**, v.1, p.43-49, 1983.
- STEVENSON, F.J., ed. **Humus chemistry: genesis, composition, reaction**. New York: John Wiley, 1982.
- WEBLEY, D.M.; DUFF, R.B.; BACON, J.S.D.; FARMER, V.C. **Journal of Soil Science**, v.16, p.149-157, 1965.



# **XX. ESTIMATIVA DA QUALIDADE DE RESÍDUOS VEGETAIS INCORPORADOS AO SOLO E SUA IMPORTÂNCIA NA CICLAGEM DE NUTRIENTES**

Shirlei Scramin

## **Introdução**

O trabalho consiste em determinar as porcentagens de lignina, celulose, polifenóis, C e N de resíduos de plantas (invasoras e/ou cultivadas). Posteriormente, determinam-se a relação C/N e sua correlação com os teores de lignina, celulose e polifenóis. A diversidade e a qualidade das plantas invasoras e os restos de cultura incorporados ao solo, como adubo verde, são importantes fatores que contribuem para o desempenho da atividade microbiana do solo e, conseqüentemente, para sua fertilidade.

O alto teor de lignina em um resíduo vegetal reduz a velocidade de sua decomposição, liberando-se lentamente os nutrientes para o solo (Meentmeyer, 1978; Berendse et al., 1987). É conhecido, também, que a decomposição desses resíduos está relacionada à relação C/N, que é um indicador da velocidade de mineralização, juntamente com os teores de lignina (Berendse et al.; 1987; Fox et al., 1990; Tian et al.; 1992a e 1992b). Outros indicadores que diferenciam as velocidades de decomposição de folhas, brotos e raízes entre as espécies vegetais são: a relação polifenol/N e relação polifenol+lignina/N (Lehmann et al., 1995). Os polissacarídeos (celulose e hemicelulose), devido ao seu rápido metabolismo, formam a biomassa microbiana (Lassus, 1990). O alto teor de polifenóis também leva à lenta liberação dos nutrientes para o solo, devido à combinação entre esses compostos com as proteínas e aminoácidos vegetais para formarem substâncias húmicas, diminuindo-se assim a decomposição dos resíduos vegetais e, conseqüentemente, diminuindo a liberação de nutrientes (Fox et al., 1990). Portanto, a formação das substâncias húmicas do solo depende basicamente da quantidade e da composição de resíduos vegetais (Rasmussen & Collins, 1991).

As plantas que apresentarem a relação C/N em torno de 12 a 15 (Tian et al., 1992b), baixo valor para lignina e teor de polifenóis em torno de 0,5 a 5%, são plantas que podem ser consideradas como de alta qualidade, cujos resíduos vegetais, ao serem incorporados ao solo, liberarão mais rapidamente os nutrientes e, conseqüentemente, aumentarão a fertilidade do solo.

## **Análise de Polifenóis**

O método adotado é o de Folin-Denis, cuja técnica permite a análise de polifenóis solúveis totais contidos no material vegetal (aqui estão inclusos os taninos hidrolizáveis e condensados, bem como polifenóis não-tanínicos) (Anderson & Ingram, 1993).

## Reagentes

Metanol/H<sub>2</sub>O, 50%

Ácido ortofosfórico

Ácido fosfomolibdico

Carbonato de sódio, 17% (17g/100mL de água destilada )

Tungstato de sódio

Ácido tânico

Reagente de Folin-Denis: Adicionar 50g de tungstato de sódio, 10g de ácido fosfomolibdico e 25mL de ácido ortofosfórico a 375mL de H<sub>2</sub>O destilada. Refluxar por 2 horas (com pedras de destilação ou porcelana para evitar super aquecimento). Esfriar e diluir para 500mL com H<sub>2</sub>O.

## Padrões

1. Ácido tânico, 0,1mg mL<sup>-1</sup>: dissolver 0.050g de ácido tânico em balão volumétrico de 500mL.
2. Usando 0, 1, 2, 3, 4, 5mL do padrão de ácido tânico, no lugar de 1mL da amostra, seguir o procedimento a partir da etapa 4.

## Procedimentos

1. Pesar cerca de 0,75g ± 0,001g (W) do material vegetal em um béquer de 50mL.;
2. Adicionar 20mL de metanol 50%, cobrir o frasco com parafilme (ou magipack) e colocar em banho-maria a 77-78°C por 1 hora;
3. Filtrar quantitativamente (papel Whatman nº 1) o extrato para um balão volumétrico de 50mL, usando metanol 50% para lavar o resíduo vegetal e completar o volume com H<sub>2</sub>O destilada. Misturar bem;
4. Pipetar 1mL da amostra ou do padrão em um balão volumétrico de 50mL, adicionar 20mL de H<sub>2</sub>O destilada, 2,5mL de reagente Folin-

Denis e 10mL de solução de carbonato de sódio 17%;

5. Completar com H<sub>2</sub>O destilada, misturar bem e deixar em repouso por 20 minutos. Filtrar em papel Whatman nº 1 antes de fazer a leitura;
6. Ler as absorbâncias do padrão e da amostra em espectrofotômetro a 760nm.

### Cálculo

1. Construir um gráfico de absorbância x concentração;
2. Determinar as concentrações para cada amostra;

Polifenóis totais extraídos (%) =  $C * 5 / W$

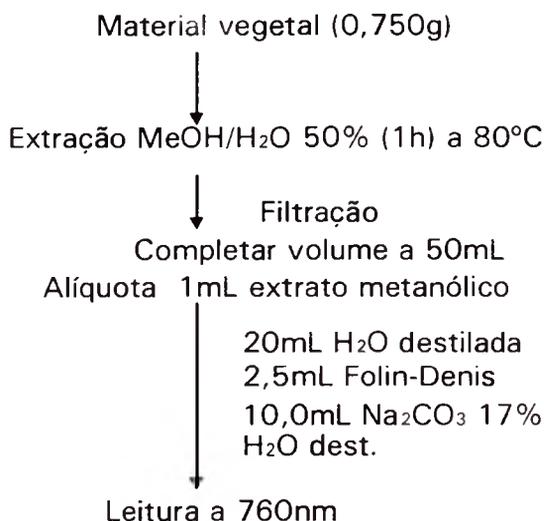
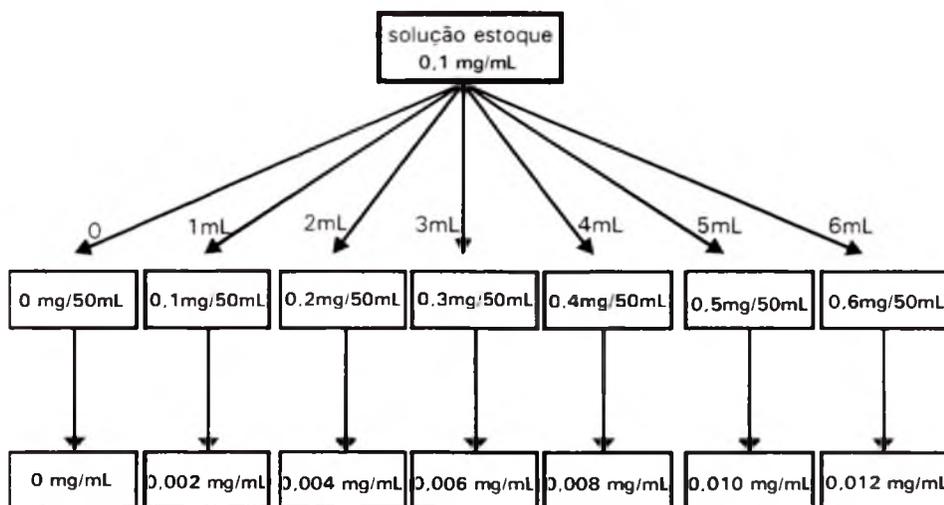


Figura 1. Fluxograma para análise de polifenóis

Para calcular as concentrações das amostras, prepara-se a curva de calibração com diferentes concentrações de ácido tânico, no mínimo 5 ou mais pontos na curva *versus* as respectivas absorbâncias. Aplicando-se a equação da reta (em programa do Excel) obtém-se o coeficiente de correlação,

o que nos permite obter a concentração de polifenóis em cada amostra. Aplicando o valor de  $C$  na fórmula tem-se a porcentagem de polifenóis em cada amostra.



$$0,1\text{mg} \text{-----} 50\text{mL}$$

$$x \text{-----} 1\text{mL}$$

$$x = 0,002\text{mgmL}^{-1}$$

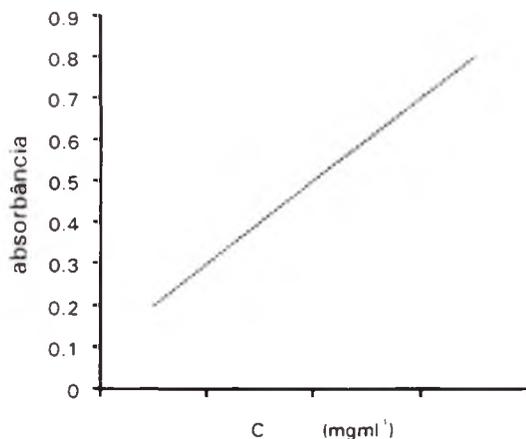


Figura 2. Obtenção da curva de calibração com padrão de ácido tânico para análise de polifenóis (conc. x absorbâncias).

Na equação da reta:  $y = a + b * x$  substituímos cada uma das variáveis pelos valores encontrados;  $y = \text{abs. (nm)}$ ,  $a = \text{inclinação da reta}$ ,  $b = \text{intersecção da reta}$ ,  $x = \text{concentração (padrão)}$ .

Conc. Padrão = X	Resp. = Abs.	a	0.100234667
0	0.0746	b	33.09733333
0.002	0.16238	cc	0.996022926
0.004	0,24284		
0.006	0.32073	<b>Curva-padrão</b>	
0.008	0.36579		
0.01	0.44838		
0.012	0.50348		
0.014	0.55939		
0.016	0.60753		

**\*\*Obs.:** na determinação de ácidos polifenólicos e de taninos em extratos aquosos de solo foi utilizado o reagente de Folin-Denis e o Sistema Technicon Autoanalyser II (Tel & Covert, 1992).

## **Análise de Lignina e Celulose via *Acid Detergent Fibre (ADF)***

*Acid Detergent Fibre* é preparado a partir do material vegetal por ebulição com uma solução de ácido sulfúrico do brometo de cetiltrimetilamônio (cetyltrimethylamonium bromide) (CTAB), sob condições controladas. O CTAB dissolve quase todos os constituintes nitrogenados e o ácido hidrolisa o amido, deixando um resíduo contendo lignina, celulose e cinzas. A lignina é removida por oxidação com uma solução tamponada de permanganato de potássio e então a celulose é determinada pela perda de peso após a formação das cinzas (Anderson & Ingran, 1993 ).

## Reagentes para ADF

Acetona

Solução anti-espumante: 2-octanol

Solução de ácido sulfúrico 0,5M

CTAB = cetyltrimethylammonium bromide

## Preparo da solução

Solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/CTAB: dissolver 100g de CTAB em 5 L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5M. Filtrar se houver turvação.

## Procedimentos para ADF

1. Pesar cerca de 1,00 ± 0,001g de material vegetal em um balão de fundo redondo (250mL) com junta esmerilhada para se adaptar o condensador (W1);
2. Adicionar 100mL da solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/CTAB e umas poucas gotas de anti-espumante;
3. Conectar um condensador e refluxar por 1 hora;
4. Filtrar a quente através de um cadinho de placa porosa nº 1 de peso conhecido (W2), sob suave sucção (ou vácuo);
5. Lavar o resíduo (3 vezes) com 50mL de água fervente;
6. Lavar com acetona até que o solvente fique descolorido. Fazer sucção da fibra seca;
7. Secar em um forno a 105°C por 2 horas, esfriar em um dessecador e re-pesar (W3).

## Cálculo

$$\text{ADF(\%)} \text{ contendo cinza} = (W3-W2)/W1 * 100$$

## Reagentes para Lignina e Celulose

Ácido acético glacial

Etanol

HCl

Nitrato férrico [Fe (NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.9H<sub>2</sub>O]

Álcool terc-butílico

Ácido oxálico, diidratado

Acetato de potássio e Permanganato de potássio (KMnO<sub>4</sub>)

Nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>)

Sulfato de prata (Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

## Preparo de soluções

Permanganato de potássio saturado: dissolver 50g de KMnO<sub>4</sub> e 0,05g de Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em H<sub>2</sub>O destilada e diluir para 1000mL com H<sub>2</sub>O destilada. Estocar em frasco escuro.

## Tampão Lignina

Dissolver 6g de Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.9H<sub>2</sub>O e 0,15g de AgNO<sub>3</sub> em H<sub>2</sub>O destilada. Adicionar 500mL de ácido acético glacial, 5 g de acetato de potássio, 400 mL de álcool t-butílico e diluir para 1000mL com H<sub>2</sub>O destilada. Estocar em frasco escuro.

## Tampão permanganato combinado

Misturar as soluções de permanganato saturado e tampão lignina na razão 2:1 (v/v) - é uma solução estável por uma semana no escuro a 4°C. As soluções são satisfatórias para o uso, se ambas estiverem púrpura e livre de precipitado.

## Solução desmineralizante

Dissolver 100g de ácido oxálico diidratado em 1400mL de etanol 95%. Adicione 100mL de HCl conc. e dilua para 2000mL com H<sub>2</sub>O destilada.

Etanol 80%

Diluir 1690mL de etanol 95% para 2000mL com H<sub>2</sub>O.

### **Procedimentos para a quantificação de lignina e celulose:**

1. Colocar o cadinho de placa sinterizada contendo ADF em placa de Petri contendo água gelada (1cm de altura). Não umedecer a fibra neste estágio;
2. Adicionar 25mL do combinado permanganato/tampão lignina ao cadinho;
3. Ajustar o nível de água gelada (2-3cm) na placa para reduzir a circulação (ou fluxo) da solução fora dos cadinhos;
4. Quebrar os grumos com bastão de vidro e passar a solução ao redor das paredes dos cadinhos para umedecer bem todas as partículas;
5. Deixar em repouso por 90 minutos a temperatura de 20-25°C e então adicionar mais solução combinada, se necessário, para manter a cor púrpura;
6. Filtrar sob vácuo;
7. Colocar o cadinho em placa de Petri limpa e acrescentar solução desmineralizante até a metade;
8. Deixar em repouso por 15 minutos e então filtrar sob vácuo;
9. Lavar a fibra com solução desmineralizante até a brancura (eliminar totalmente a cor púrpura);
10. Filtrar e lavar completamente com etanol 80%. Filtrar sob vácuo e repetir a lavagem por 2 vezes;
11. Lavar duas vezes, de maneira similar, com acetona;
12. Secar o cadinho por 2 horas a 105°C, esfriar em dessecador e pesar (W4);
13. Calcinar o conteúdo do cadinho, colocando-o em uma mufla a 550°C por 1 hora. Esfriar em dessecador e pesar (W5).

## Cálculos

$$\text{Lignina (\%)} = \frac{W3-W4}{W1} * 100$$

$$\text{Celulose (\%)} = \frac{W4-W5}{W1} * 100$$

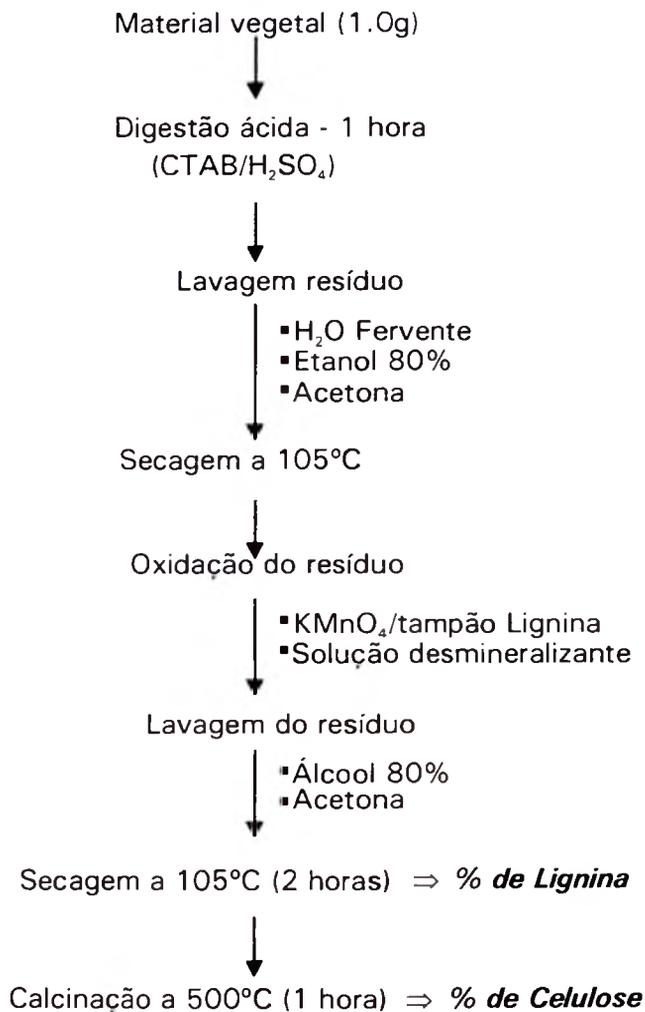


Figura 3. Fluxograma para análise de lignina e celulose

## Determinação da razão C/N

**1ª Etapa – PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS** (secar o material vegetal à 60°C em estufa com circulação de ar até peso constante e moer em moinho de facas).

### **2ª Etapa – DETERMINAÇÃO DO NITROGÊNIO TOTAL**

Este método possibilita a determinação de 5 macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg) com uma única digestão por  $H_2O_2$  e  $H_2SO_4$ . A adição prévia de  $H_2O_2$  propicia uma pré-digestão da amostra pelo  $H_2SO_4$ , em que a temperatura atinge 180-190°C. Esta oxidação parcial de compostos orgânicos evita a formação de espuma e freqüente perda de material após a adição de  $H_2SO_4$ , no início do aquecimento. Deve-se, a seguir, elevar a temperatura a 310-330°C, para obter a digestão completa do material, em bloco digestor (verificar a temperatura com o termômetro). São utilizados para a digestão das amostras, tubos de ensaio de 25 x 250mm em vidro pyrex. A diluição no próprio tubo de ensaio facilita o procedimento. A homogeneização da mistura é feita com ar comprimido. Após decantação (6-12 horas), são tiradas alíquotas do extrato para as várias determinações, não havendo necessidade de filtração (Tedesco et al., 1985).

O teor de N varia com a espécie, variedade, parte, desenvolvimento e estado nutricional da planta. Em geral situa-se entre 0,5 e 5% .

### **Reagentes e soluções**

1.  $H_2SO_4$  concentrado;
2.  $H_2O_2$  a 30%: esta solução perde  $O_2$  com o tempo e deve ser guardada em frasco protegido da luz;
3. Mistura de digestão: moer 100g de  $Na_2SO_4$ , 10g de  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  e 1,0g de selênio;

4. NaOH 10N: dissolver 400g de NaOH (grau técnico) em 800mL de H<sub>2</sub>O destilada em um béquer de pyrex. Após esfriamento, transferir para balão volumétrico de 1L e completar o volume. Guardar em recipiente plástico;
5. Indicador de ácido bórico: dissolver 40 g de ácido bórico em 1400mL de água quente. Após esfriamento, transferir para um balão volumétrico de 2L contendo 400mL de etanol 95% (produto técnico) e 40mL de solução obtida pela dissolução de 0,660 g de verde de bromocresol e 0,330g de vermelho de metila em 1000mL de etanol 95%. Misturar as soluções em balão volumétrico e adicionar cuidadosamente NaOH 0,05N até que se observe uma leve mudança da cor roxa para verde-clara ao se adicionar 1mL de H<sub>2</sub>O destilada a 1mL de indicador. Completar o volume para 2L com H<sub>2</sub>O destilada;
6. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,05N: dissolver 1,4mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc. em 1L de H<sub>2</sub>O destilada (1mL desta solução gasto na titulação corresponde a 0,7mg de N).

## Protocolo de análise

### Digestão das amostras

- Pesar 0,200g da amostra e colocar em tubo de digestão seco;
- Adicionar 1,0mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% ;
- Adicionar vagarosamente 2mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc. (**CAUIDADO: A REAÇÃO É EXOTÉRMICA**);
- Adicionar 0,7g de mistura de digestão;
- Colocar no bloco digestor a 160-180°C até evaporar a água;
- Aumentar a temperatura a 330°C. Após clarear (cor esverdeada) manter esta temperatura por uma hora;
- Retirar os frascos do bloco e deixar esfriar;
- Completar o volume com H<sub>2</sub>O destilada até a marca de aferição;

- Agitar em vortex (se o laboratório não dispuser de um vortex, pode-se borbulhar ar comprimido na solução, com ajuda de uma pipeta Pasteur).

### Determinação de Nitrogênio

- Pipetar 10mL do extrato em balão de destilação de 100mL;
- Adicionar 5mL de NaOH 10N e iniciar imediatamente a destilação por arraste a vapor (receber o destilado em erlenmeyer de 50mL contendo 5 mL de indicador -ácido bórico) ;
- Destilar até coletar em torno de 35mL de destilado;
- Titular com  $H_2SO_4$  0,050N (cada mL deste reagente utilizado na titulação corresponde a 700  $\mu g$  de N).

A destilação e titulação do extrato: é feita através da alcalinização com soda para gerar amônio, que é destilado e recolhido em solução de ácido bórico. Esta é titulada com solução de ácido sulfúrico. Assim se obtém o teor de nitrogênio.

### Cálculos

- É a fórmula a ser utilizada quando se utiliza 0,200g de amostra, destilando-se 10mL do extrato (após a diluição a 50mL) e titulando-se com  $H_2SO_4$  0,050 N.

$$\% N = (mL H^+_{am} - mL H^+_{br}) * 700 * 5 * 5 / 10.000$$

- Expressar o resultado em % de N, com 2 dígitos decimais.

### 3ª Etapa – DETERMINAÇÃO DO CARBONO

O carbono é o elemento mais abundante no tecido vegetal seco (45 a 55%) e para sua análise utiliza-se o método de oxidação do C da amostra por dicromato em meio ácido, e o excesso de  $Cr^{+6}$  é quantificado por titulação.

### Reagentes e soluções

- 1) Sulfato ferroso 0,5N ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ): dissolver 140g de sulfato ferroso em aproximadamente 400 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. Adicionar 15mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  comercial e diluir a 1L (esta solução deve ser preparada a cada 15-20 dias);
  - 2) Dicromato de potássio 1,25N ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ): pesar 61,3 g de dicromato de potássio (seco a  $105^\circ\text{C}$  por duas horas) e diluir para 1 L com  $\text{H}_2\text{O}$  destilada;
  - 3) Indicador ferroína (complexo ortofenantrolina – sulfato ferroso 0,025): dissolver 1,485g de o-fenantrolina (monohidratado) e 0,695g de sulfato ferroso em água destilada e completar o volume para 100mL;
- 3)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc.

### Procedimentos de análise

- Pesar 250mg do material (deve ser moído até passar por uma peneira de 0,5 mm) contendo de 10 a 50mg de C;
- Colocar em Erlenmeyer de 250mL e adicionar 15mL de dicromato de potássio 1,25N (com pipeta volumétrica; o dicromato é usado como padrão na titulação) e agitar levemente o frasco;
- Adicionar 30mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc.;
- Aquecer com cuidado no bico de Bunsen (utilizar um termômetro mergulhado no líquido), agitando devagar até atingir  $150^\circ\text{C}$  em aproximadamente 1 minuto e deixar esfriar;
- Adicionar 100mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada e homogeneizar;
- Adicionar 3 gotas do indicador ferroína;

- Titular com sulfato ferroso 0,5N. A cor muda de verde a vermelho, com luz transmitida.

### Cálculos

me = miliequivalente

$\% C = (me Cr_2O_7^{-2} - me Fe^{+2}) * 0,003 * 100/g$  de material

$me Cr_2O_7^{-2} = 18,75$  (se forem utilizados 15mL de  $K_2Cr_2O_7$  1,25 N)

$me Fe^{+2} = (mL \text{ de } FeSO_4 \text{ gastos na titulação da amostra}) * (N FeSO_4)$

A normalidade (N) do  $FeSO_4$  é calculada na titulação da prova em branco:

$$N = 18,75/mL FeSO_4$$

Expressar o resultado em % de C, com 2 dígitos decimais.

### 4ª Etapa – DETERMINAÇÃO DA RAZÃO C/N:

$C/N = \text{Teor de Carbono (\%)/Teor de N (\%)}$

### DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO

- Em 10mL de extrato adicionar 5mL de NaOH 10N e iniciar destilação por arraste a vapor;
- Coletar 35mL do destilado em frasco contendo o indicador ácido bórico;
- Titular com  $H_2SO_4$  0,05 N  $\Rightarrow$  TEOR DE N

### DETERMINAÇÃO DE CARBONO

- Em 0,250g de amostra adicionar 15mL de  $K_2Cr_2O_7$  1,25N;
- Adicionar 30mL de  $H_2SO_4$  conc.;
- Aquecer em bico de Bunsen por 1 minuto até atingir 150°C;
- Deixar esfriar
- Titular com  $FeSO_4$  0,50N, usando indicador ferroína  $\Rightarrow$  TEOR DE C

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, J.M.; INGRAN, J.S., ed. **Tropical biology and fertility**: a handbook of methods. 2.ed. Wallingford: Commonwealth Agricultural Bureau, 1993. p.88-92.
- BERENDSE, F.; BERG, B.; BOSSATA, E. The effect of lignin and nitrogen on the decomposition of litter in nutrient-poor ecosystems : a theoretical approach. **Canadian Journal of Botany**, v.65, p.1116-1120, 1987.
- FOX, R.H.; MYERS, R.J.K.; VALLIS, I. The nitrogen mineralization rate of legume residues in soil as influenced by their polyphenol, lignin and nitrogen contents. **Plant and Soil**, v.129, p.251-259, 1990.
- LASSUS, C. Composição dos resíduos vegetais em um solo manejado com nove sistemas de culturas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.14, p.375-380, 1990.
- LEHMANN, J.; SCHROTH, G.; ZECH, W. Decomposition and nutrient release from leaves, twigs and roots of three alley-cropped tree legumes in central Togo. **Agroforestry Systems**, v.29, p. 21-36, 1995.
- MEENTMEYER, V. Microclimate and lignin control of litter decomposition. **Ecology**, v.59, p.404-472, 1978.
- RASSMUSSEN, P.E.; COLLINS, H.P. Long term impacts of tillage, fertilizer, and crop residue on soil organic matter in temperate semiarid regions. **Advances in Agronomy**, v.45, p.93-134, 1991.
- TEDESCO, M.J.; VOLKEISS, S.J.; BOHNEN, H. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: UFRGS- Faculdade de Agronomia, Departamento de Solos, 1985. 188p. (Boletim Técnico).
- TEL, D.A.; COVERT, J.A. Determination of phenolic acids and tannins in soil water extracts using the Technicon Autoanalyser II system. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.23, n.17/20, p.2737-2747, 1992.
- TIAN, G.; KANG, B.T.; BRUSSARDI, L. Effects of composition on N, Ca and Mg release during incubation of leaves from selected agroforestry and fallow species. **Soil Biology and Biochemistry**, v.15, p.1-17, 1992a.
- TIAN, G.; KANG, B.T.; BRUSSARDI, L. Biological effects of plant residues with contrasting chemical under humid tropical conditions- decomposition and nutrients release. **Soil Biology and Biochemistry**, v.24, n.10, p.1051-1060, 1992b.

# XXI. PERFIL DE ENRAIZAMENTO COMO INDICADOR BIOLÓGICO DA QUALIDADE FÍSICA DO SOLO

Heloísa Ferreira Filizola

## Introdução

A maior parte das áreas agrícolas apresenta um horizonte superficial, horizonte Ap, completamente desprovido de sua estrutura natural e, abaixo deste, um horizonte compactado, ambos fruto das práticas agrícolas. Estes horizontes têm funcionamentos muito diferenciados. No primeiro, dado o novo arranjo dos agregados ou a sua inexistência, as raízes têm um bom desenvolvimento, que é barrado pelo horizonte compactado, restringindo assim a área de desenvolvimento delas.

Além das técnicas freqüentemente utilizadas na avaliação da estrutura dos solos como determinação da densidade e estabilidade dos agregados em laboratório, capacidade de infiltração e resistência à penetração no âmbito do campo, utiliza-se o perfil de enraizamento proposto por Bohm (1979) e

modificado por Crestana et al. (1994) na avaliação das reações das plantas às condições a que estão submetidas.

## Procedimento

Na metodologia proposta por Crestana et al. (1994), através do processamento de imagens, é possível obter-se uma análise quantitativa das raízes no perfil do solo, por meio de sua densidade.

A partir de trincheiras locadas sobre diferentes parcelas, é feito o levantamento das estruturas e sua distribuição, associando-se a elas dados analíticos, permitindo assim analisar esta parcela do solo de forma global.

As trincheiras devem ser abertas próximas à linha de plantio (< 10cm da planta). Em geral, no caso de culturas anuais, o perfil observado é de, no máximo, 100cm de largura por 100cm de profundidade. Sendo assim, a trincheira a ser aberta deverá ter as seguintes dimensões: 120cm de profundidade, 120cm de comprimento e 150cm de largura. A largura deve ser suficiente para se posicionar a câmera fotográfica ou filmadora. No caso de árvores ou culturas perenes é necessária a abertura de uma trincheira maior, tanto em largura quanto em profundidade.

Uma vez aberta a trincheira, deixar suas paredes o mais vertical possível, com o auxílio de uma pá. Para a exposição das raízes, remover o solo da parede do perfil, até que elas fiquem expostas; para tanto, utiliza-se uma faca ou estilete. Dependendo da cultura e do tipo de solo, este preparo pode não ser tão simples, requerendo o uso de outros instrumentos, como um rastelo manual ou um escarificador (rolo cilíndrico com pregos dispostos na forma de uma espiral). Esses procedimentos não devem provocar muita deformação no perfil e devem permitir boa exposição das raízes.

Apesar de as raízes, em geral, ficarem expostas com o preparo, muitas vezes o contraste solo-raiz não é suficiente. Neste caso, as imagens obtidas não são adequadas para a análise, portanto torna-se necessário um tratamento

complementar: pintura das raízes e lavagem do perfil de solo. Em alguns casos, somente a lavagem das raízes e umedecimento do perfil já é suficiente.

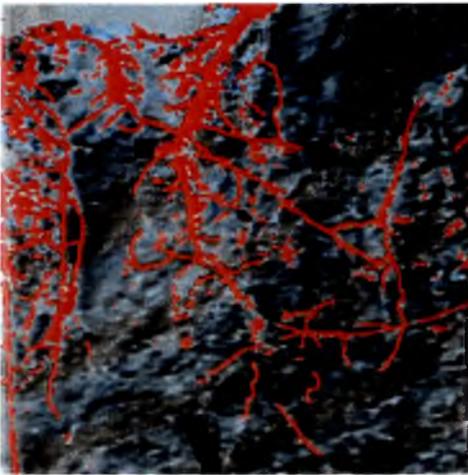
Para a pintura, utiliza-se esmalte sintético em *spray*, em geral branco, que deve ser aplicado sobre as raízes. Uma vez aplicado o esmalte, este adere às raízes e também ao solo. Portanto, através de um pulverizador costal ou mesmo manual com água, ou ainda uma mangueira, deve-se efetuar a lavagem do perfil, procurando-se destacar uma fina camada de solo. Antes do processo de lavagem, deve-se esperar, em média 30 segundos, para que a tinta seque.

Antes de se iniciarem as filmagens, coloca-se, sobre o perfil a ser filmado, uma tela de 1 x 1m (no caso de culturas anuais) quadriculada. O tamanho da malha da tela varia de acordo com o tipo de estudo a ser feito. Normalmente utiliza-se uma tela de 10 x 10cm. Cada divisão deve ser identificada.

Utilizando-se uma máquina fotográfica ou uma filmadora, obtêm-se as imagens do perfil. A filmagem ou as sessões de fotografias do perfil devem ser feitas levando-se em consideração a posição da câmera em relação ao perfil, quantidade de luz ou iluminação do perfil e a demarcação da área a ser analisada. A câmera deve ser posicionada perpendicularmente em relação ao perfil a ser filmado; este deve estar na sombra, e a área a ser filmada deve estar devidamente identificada e demarcada. Em geral, filma-se cada área do perfil por 15 segundos.

Posteriormente as imagens são então digitalizadas com resolução espacial de 640 X 480 pixels com 256 cores/pixels, através de uma câmera fotográfica digital ou de uma placa digitalizadora ligada a um computador, ou ainda conectando-se um vídeo cassete e um monitor de TV a um microcomputador com placa digitalizadora (Basso & Assis, 1997; Guimarães et al., 1997) e, em seguida, são tratadas para melhor visualização das raízes. Uma vez digitalizadas e armazenadas em arquivos padrões BMP (extensão de nome de arquivo para arquivos de bitmap para Windows) ou PCX (extensão de nome de arquivo para arquivos bitmap criados por programas de pintura

como o PaintBrush para PC), emprega-se um software, o SIARCS, desenvolvido pela Embrapa Instrumentação Agropecuária para a sua análise (Figura 1 e 2).



Exemplo de imagem digitalizada de um horizonte Ap

Figura 1. Exemplo de uma imagem referente ao horizonte Ap

Como a imagem digitalizada possui uma representação binária, torna-se fácil automatizar o processo de contagem e o cálculo da densidade de raízes, assim como o tratamento estatístico desejado, via SIARCS, que possui ferramentas que permitem a manipulação da imagem de forma a selecionar as raízes e calcular sua distribuição. As raízes devem ser realçadas para dar melhor contraste e, no processo de transformação em pixels, não haver perda das mesmas. Para este processo, podem ser utilizados programas gráficos como o Corel Draw ou o Adobe.

As avaliações (estrutura e enraizamento) normalmente são feitas no período da floração, quando as raízes atingem o máximo de desenvolvimento.

## Resultados

A área de cálculo é determinada de acordo com a especificidade e o grau de detalhe requeridos pelo objetivo do trabalho. No caso presente, como o objetivo era a avaliação dos efeitos da compactação sobre as raízes e comparação de dois tratamentos diferentes, esses resultados foram depois agrupados por imagem (malha de 20 X 20cm).

Os dados agrupados foram transformados em gráficos (Figura 3) para a visualização das diferenças entre os tratamentos aplicados e a área de mata. Como pode ser observado, existe pouca diferença entre o enraizamento nos dois tratamentos, mas há uma tendência a um melhor enraizamento na área de agricultura biodinâmica, que se aproxima da distribuição da área de mato, após dois anos de tratamento.

Tabela 1. Porcentagem de raízes calculada a partir da imagem digitalizada (Figura 1):

cada valor eqüivale à porcentagem de raízes em 4 cm<sup>2</sup>.

21.45	26.47	19.83	31.02	35.88	0.00	0.00	0.00	2.85	5.12
47.38	21.68	34.65	63.50	18.90	0.00	0.00	4.24	0.46	5.06
36.50	16.90	18.60	46.60	27.55	4.78	0.62	9.18	9.10	3.89
47.22	18.52	7.18	37.27	20.14	8.41	17.05	6.17	9.10	6.67
33.72	20.14	17.59	30.86	14.12	10.88	21.60	5.40	15.35	13.52
29.32	18.98	0.69	9.80	12.65	20.52	10.88	14.74	16.67	26.73
25.85	2.85	0.15	5.86	11.34	6.87	5.79	1.54	11.27	12.53
10.65	1.31	0.00	0.08	4.63	8.41	0.00	0.00	1.47	4.32
6.87	0.15	0.00	0.00	0.00	1.23	0.00	0.00	0.93	2.90
5.21	0.00	0.00	0.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

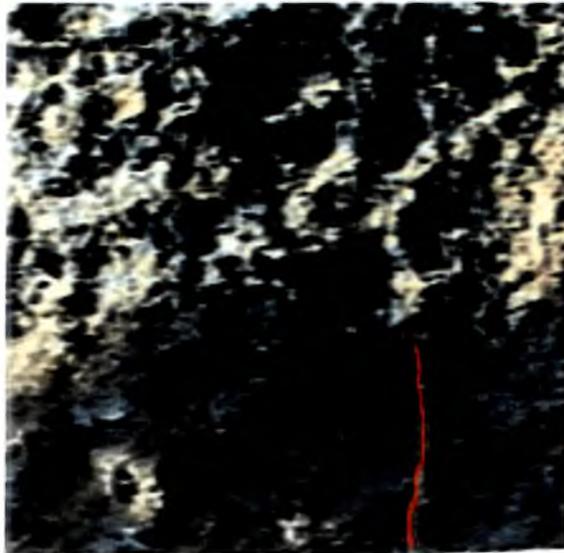


Figura 2. Exemplo de uma imagem referente ao horizonte compactado.

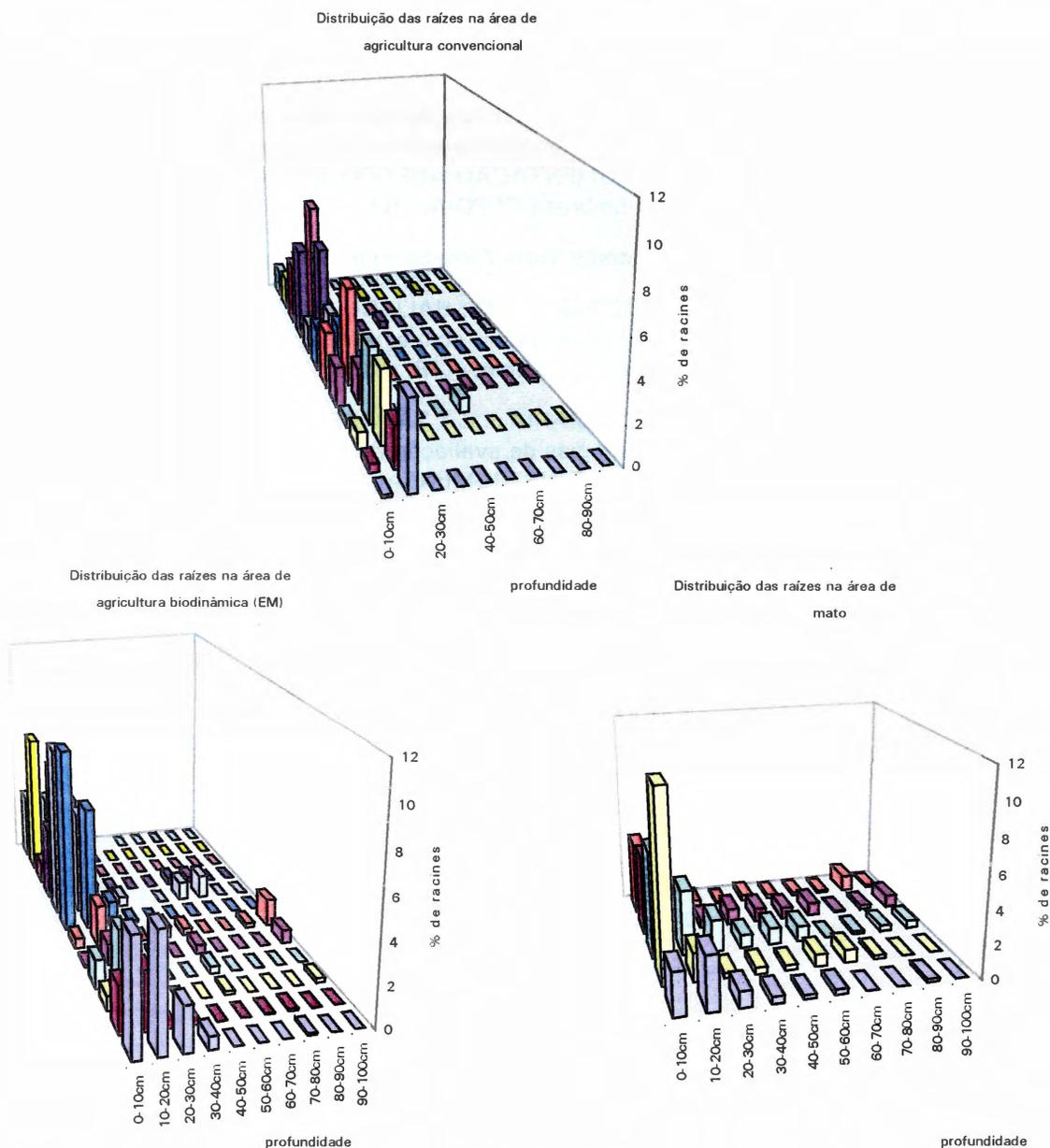


Figura 3. Gráficos comparativos da distribuição de raízes em área de agricultura convencional, de agricultura biodinâmica e em área de mato.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASSOI, L.H.; ASSIS, J.S. Considerações sobre a utilização dos métodos do perfil auxiliado pelo processamento de imagens digitais e do monolito na análise da distribuição de raízes no solo. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE INSTRUMENTAÇÃO AGROPECUÁRIA (SIAGRO), 1., 1997, São Carlos, SP. **Anais...** São Carlos: Embrapa-CNPDIA, 1997.

BOHM, W. **Methods of studing root systems**. New York: Springer-Verlag, 1979. 194p.

CRESTANA, S.; GUIMARÃES, M.F.; JORGE, L.A.C.; RALISCH, R.; TOZZI, C.L.; TORRE, A.; VAZ, C.M.P. Avaliação da distribuição de raízes no solo auxiliada por processamento de imagens digitais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.18, n.3, p.365-371, 1994.

GUIMARÃES, M.F.; JORGE, L.C.A.; DE MARIA, I.C.; TAVARES FILHO, J.; BICUDO, S.J.; CRESTANA, S. (1997). Três metodologias de avaliação de raízes: descrição, limitações e vantagens. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE INSTRUMENTAÇÃO AGROPECUÁRIA (SIAGRO), 1., 1997, São Carlos, SP. **Anais...** São Carlos: Embrapa-CNPDIA, 1997.

