UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Ciências Biológicas - Bacharelado

Trabalho Acadêmico

Diversidade microbiológica cultivável de solos e seu potencial para avaliação da qualidade do solo

Marina Schneid Alves

Pelotas, 2013

MARINA SCHNEID ALVES

DIVERSIDADE MICROBIOLÓGICA CULTIVÁVEL DE SOLOS E SEU POTENCIAL PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO SOLO

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Anelise Vicentini Kuss

Pelotas, 2013

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

A474d Alves, Marina Schneid
Diversidade microbiológica cultivável de solos e seu potencial para avaliação da qualidade do solo / Marina Schneid Alves. – 61f. : il. color. – Monografia (Conclusão de curso). Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2013. – Orientador Anelise Vicentini Kuss.

1.Biologia. 2.Celulases. 3.Fosfatases. 4. Diazotróficas. 5.Qualidade do solo. 6.Grupos funcionais. 6.Manejo ecológico. I.Kuss, Marina Schneid. II.Título.

CDD: 578.757

Banca examinadora:

Dr.ª Anelise Vicentini Kuss (Orientadora)

Dr.ª Gladis Aver Ribeiro

Dr.º Eduardo Bernardi

Drª Ana Claúdia Lima (Suplente)

Agradecimentos

Á prof. Dr.ª Anelise Vicentini Kuss, que mais que orientadora tornou-se uma grande amiga, agradeço pelos ensinamentos e paciência, pela parceria de trabalho, pelo saber ouvir e aconselhar.

Ás colegas de trabalho e amigas Mariana Pereira, Chayane Flores, Aline Saller e Greice Peil, pelo companheirismo e dedicação, sem elas este trabalho não aconteceria.

Ao meu amor Diego Rosa da Silva, por me acompanhar e apoiar em todas as minhas decisões, pela paciência e dedicação, companheiro, amigo e cúmplice em todos os momentos. Porque “ninguém é tão louco que não possa encontrar outro louco que o entenda” (Anônimo).

Á minha filha Isadora por completar minha vida e permanecer ao meu lado me alegrando nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais Gustavo e Márcia e minha irmã Paula por sempre acreditarem em mim de forma incondicional, e darem o apoio necessário para que eu pudesse alcançar e vencer mais esta etapa.

Aos meus novos parentes Nara, Fábio e Daniella, pelo apoio e amizade.

Resumo

ALVES, Marina Schneid. **Diversidade microbiológica cultivável de solos e seu potencial para avaliação da qualidade do solo.** 2013. 61f. Trabalho acadêmico. Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A microbiota edáfica apresenta uma grande importância nos processos ecológicos, pois influencia diretamente na transformação de nutrientes e compostos orgânicos. Sua diversidade pode ser avaliada por diversas técnicas, tal como a tradicional contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC). O trabalho pretende corroborar a relação positiva da diversidade microbiológica em sistemas naturais e de produção ecológica na região sul do Rio Grande do Sul, utilizando-a para avaliação da qualidade ambiental, bem como identificar microrganismos produtores de enzimas. Este trabalho foi realizado na Estação Experimental Cascata (EEC) da EMBRAPA Clima Temperado, no município de Pelotas/RS, utilizando-se como áreas amostrais um fragmento de mata nativa (área 1), campo em *pousio* por três anos (em recuperação ambiental) (área 2), e cultivo de hortaliças manejado dentro dos princípios orgânicos durante 7 anos (área 3). Foi avaliada a densidade populacional total de bactérias aeróbias, fungos, bactérias produtoras de celulase, bactérias solubilizadoras de fosfato e bactérias fixadoras de nitrogênio (diazotróficas), através da diluição seriada do solo com contagem de unidades formadoras de colônia e número mais provável (para as diazotróficas). Os ecossistemas mata nativa e campo em reabilitação ambiental, em geral, não apresentaram diferenças estatísticas em relação a população de bactérias aeróbias, fungos e bactérias produtoras de celulases, portanto podemos considerar tais áreas com baixos impactos de degradação. A área de cultivo de hortaliças, de uma forma geral, obteve valores altos na contagem total de bactérias aeróbias e fungos, bactérias produtoras de celulases e solubilizadoras de fosfato, em relação às outras áreas analisadas. Contudo, com apenas duas análises não foi possível avaliar qualidade microbiológica do solo do agroecossistema, visto as interferências de diversos parâmetros nas populações de micro-organismos. A população de bactérias diazotróficas nas três áreas não apresentou diferenças estatísticas, supondo que este grupo funcional suporta maiores alterações ambientais. Contudo as variáveis analisadas foram consideradas boas indicadoras para avaliar a qualidade microbiológica do solo.

Palavras chave: Celulases. Diazotróficos. Fosfatases. Grupos funcionais. Manejo ecológico.

Abstract

ALVES, Marina Schneid. **Diversidade microbiológica cultivável de solos e seu potencial para avaliação da qualidade do solo.** 2013. 61f. Trabalho acadêmico. Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The edaphic microflora is of great importance in ecological processes, as they have direct influence on the processing of nutrients and organic compounds. Their diversity can be assessed by various techniques, such as traditional counting Colony Forming Units (CFU). This work intends to corroborate the positive relationship of microbial diversity in natural systems and ecological production the southern region of Rio Grande do Sul, using it to evaluate environmental quality; it also aims to identify microorganisms that produce enzymes. This work was conducted at the Experimental Cascata (EEC), EMBRAPA Clima Temperado in the city of Pelotas/RS, using as sample areas: a fragment of native forest (area 1), field fallow for three years (environmental restoration) (area 2), and beds of vegetables managed within the organic principles during seven years (area 3). Was evaluated total density of aerobic bacteria, fungi, bacteria degrade cellulose, phosphate solubilizing bacteria and nitrogen-fixing bacteria (diazotrophics), by serial dilution of the soil with counting colony forming units and most probable number (for diazotrophic). The ecosystems native forest and environmental rehabilitation field, in general, not statistically different with respect the population of aerobic bacteria, fungi and bacteria degrade cellulose, so we can consider areas with low impacts of degradation. The area of cultivation of vegetables, in general, had higher values in the count total aerobic bacteria, fungi, bacteria degrade cellulose and phosphate solubilizing, in relation of other area examined. However, only two analysis was not possible to evaluate microbiologic quality agroecosystem soil, due to interference of the several environmental parameters in populations of micro-organisms. The count of diazotrophs in the three areas showed no statistical differences, supposing that this functional group supports higher environmental changes. However the variables studied were considered good indicators to assess microbiological soil quality.

Keywords: Cellulase. Phosphatase. Diazotrophics. Ecological management. Functional groups.

Lista de figuras

Figura 1	A matéria orgânica como moduladora das propriedades e funções do solo	17
Figura 2	Representação do microambiente de filme de água no solo contendo célula microbiana, argila, coloides orgânicos, cátions orgânicos e inorgânicos adsorvidos e íons repelidos	18
Figura 3	Fluxo e principais transformações dos nutrientes carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre	21
Figura 4	Fragmento de mata nativa (Área 1)	31
Figura 5	Campo em *pousio* (Área 2)	32
Figura 6	Canteiros de produção de hortaliças sob manejo ecológico (Área 3)	32
Figura 7	Distribuição das nove subamostras nas áreas amostrais: fragmento de mata nativa (área 1), campo em *pousio* (área 2)	33
Figura 8	Distribuição das nove subamostras na área de canteiros de cultivo ecológico de hortaliças (área 3)	34
Figura 9	Homogeneização e retirada de materiais estranhos de amostra de solo	34
Figura 10	Diluição seriada de amostra de solo	35
Figura 11	Placa de Petri contendo colônia com halo transparente em seu redor indicando produção de celulase	36
Figura 12	Placa de Petri contendo colônias com halo transparente ao seu redor indicando solubilização do fosfato encontrado no meio de cultura	37
Figura 13	Frascos apresentando película aerotáxica encontrada em meio semi-sólido indicando a presença de bactérias fixadoras de nitrogênio	38

Lista de tabelas

Tabela 1 Principais processos e mecanismos de transformações bioquímicas que regulam a ciclagem dos elementos ... 22

Tabela 2 Número de micro-organismos (log_{10}) relacionados às três áreas amostrais obtidos na primeira coleta. Média de cinco repetições 40

Tabela 3 Número de micro-organismos (log_{10}) relacionados às três áreas amostrais obtidos na segunda coleta. Média de cinco repetições 43

Tabela 4 Número de bactérias diazotróficas (log_{10}) relacionadas aos meios NFb, JNFb, JMV, LGI e LGI-P, presente nas três áreas amostrais, obtidos na primeira e segunda coleta. Média de três repetições 47

Tabela 5 Número de bactérias diazotróficas (log_{10}) relacionadas aos meios NFb, JNFb, JMV, LGI e LGI-P, presente nas três áreas amostrais, obtidos na segunda coleta. Média de três repetições 48

Sumário

1 Introdução 11

2 Revisão bibliográfica 13

2.1 Solo e micro-organismos 13

2.1.1 Micro-organismos edáficos 19

2.2 Ecologia microbiana 21

2.2.1 Diversidade funcional 21

2.3 Bioindicadores de qualidade do solo 27

2.4 Manejo ecológico do solo 28

3 Material e métodos 32

3.1 Área de estudo 32

3.2 Coleta, armazenamento e preparação das amostras 34

3.3 Análise microbiológica 36

3.3.1 Total de bactérias aeróbias 36

3.3.2 Bactérias produtoras de celulase 37

3.3.3 Bactérias solubilizadoras de fosfato 37

3.3.4 Bactérias diazotróficas 38

3.3.5 Total de fungos 39

3.4 Análise estatística 40

4 Resultados e discussão 41

4.1 Primeira coleta 41

4.2 Segunda coleta 44

4.3 Bactérias diazotróficas 48

5 Conclusões 53

Referências 55

1 Introdução

A microbiota edáfica apresenta uma grande importância nos processos biológicos e bioquímicos, pois influenciam diretamente na transformação de nutrientes e compostos orgânicos (VINHAL-FREITAS et al., 2010).

A diversidade microbiana pode ser avaliada por diversas técnicas, inclusive a tradicional contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) resultante da inoculação de diluições seriadas de uma suspensão de solo (NANNIPIERI et al., 2003). Esta técnica permite avaliar a densidade populacional de micro-organismos cultiváveis e identificar micro-organismos específicos tais como solubilizadores de fosfatos e produtoras de celulases. Essas avaliações são importantes para estabelecer as relações ecológicas que ocorrem no solo e no seu entorno, bem como identificar fatores que exercem influência no equilíbrio microbiológico dos solos e a relação entre os diferentes grupos e espécies de micro-organismos (PEREIRA; NEVES; DROZDOWICZ 1996).

Atualmente, a sociedade procura a associação entre produção de alimentos e preservação ambiental, trazendo um grande desafio que é a “integração dos fatores biológicos nos sistemas de produção” (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Na conversão de sistemas naturais para agrícolas a microbiota do solo é diretamente afetada, alterando-se os processos ecológicos do ambiente (ZILLI et al., 2003). Por isso, os sistemas de manejo ecológico buscam reproduzir as condições dos ambientes sem interferência antrópica, a fim de manter a diversidade biológica do local, bem como sua produtividade, capacidade de regeneração e habilidade de executar significativas funções ecológicas, econômicas e sociais sem ameaçar outros ecossistemas (ALTIERI, 2004).

Portanto, o presente trabalho tem como objetivos quantificar a população total cultivável de bactérias aeróbias e fungos em amostras de solo com diferentes manejos, identificar as alterações na comunidade microbiológica do solo sob cultivo

ecológico em comparação a um solo sob vegetação nativa e em *pousio*, indicar a qualidade microbiológica do solo da área de cultivo de hortaliças sob manejo de base ecológica através de sua comunidade microbiológica e quantificar micro-organismos com capacidade de produção de enzimas para degradação de celulose e fosfatos e micro-organismos fixadores de nitrogênio.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Solo e micro-organismos

Uma das primeiras definições dada ao solo foi sugerida por Dokuchaev, na metade do século XIX, considerado um dos pioneiros em pedologia, que reconheceu como um corpo natural independente, constituído de materiais minerais e orgânicos, organizado em horizontes ou camadas resultantes do material de origem, clima, relevo e a ação prolongada exercida por organismos vivos (KLAMT; REINERT, 2003).

Raij (1981) conceituou o solo como a parte superficial intemperizada da crosta terrestre, não consolidado, contendo matéria orgânica e seres vivos, formando aglomerados de partículas unitárias de vários tamanhos.

Segundo Moreira e Siqueira (2006) o solo é um hábitat, e como tal é heterogênio, descontínuo e estruturado, possuindo micro-habitats com diferentes características químicas, físicas e comunidades biológicas, interdependentes. É nestes micro-habitats que se encontram as populações microbianas, que interferem e são interferidas diretamente pelas características do ecossistema.

Do ponto de vista físico, o solo é um sistema trifásico, com uma fase sólida relativamente estável, entremeada por volumes variáveis de água com materiais dissolvidos, compondo a fase líquida, complementar aos espaços ocupados por ar (FEREIRA; SCHWARZ; STRECK, 2000).

O solo pode não ser uma entidade viva, mas comporta-se como tal, pois funciona como um grande reator onde ocorrem diversas reações bioquímicas complexas sendo muitas delas mediadas ou realizadas pelos micro-organismos edáficos (PAULUS; MULLER; BARCELLOS, 2000).

Para o propósito deste trabalho, e para subsidiar as discussões a seguir, tomou-se como base o conceito de solo como um componente biologicamente ativo, dinâmico e natural que recicla detritos, promove o crescimento vegetal, armazena água e age como uma fonte básica de vida para todos os seres vivos, mantendo o

equilíbrio dinâmico entre suas partes constituintes: água, gases, frações minerais, organismos vivos e matéria orgânica (MORROW, 1993).

O solo surge como resultado da degradação de rochas matrizes e o enriquecimento com matéria orgânica e seres vivos. O intemperismo pode ser conceituado como a decomposição e desintegração de rochas e minerais por processos físicos, químicos e biológicos, sofrendo influência do ambiente (fatores pedogenéticos), condicionando a atuação de diferentes processos pedogenéticos ao longo do tempo. (ARAÚJO; HUNGRIA, 1994).

De acordo com os processos de intemperismo e seu material de origem, as substâncias formadoras do solo se depositam em camadas, que se encontram mais ou menos paralelas a superfície, e às quais denominamos horizontes. Estes horizontes recebem uma denominação de acordo com sua composição, alguns dos que apresentam atividade de seres vivos são:a parte mais superficial, chamada também de horizonte O, uma camada delgada composta por matéria orgânica em sua maioria, também denominada de serrapilheira, e ocorre em poucos solos; o horizonte A é a camada mineral mais próxima da superfície, e possui um nível considerável de matéria orgânica, onde se localiza a maior parte da fração biológica do solo e consequentemente as reações biogeoquímicas; uma região de cor mais intensa, composta basicamente por minerais e algumas raízes que alcançam regiões mais profundas do solo, denominada horizonte B.Ao conjunto destes horizontes damos o nome de perfil do solo, que não apresenta um padrão global (KLAMT; REINERT, 2003).

A composição do solo é diferente para cada ecossistema. De uma forma geral, apenas nove elementos constituem a maior parte das rochas matrizes, são eles: oxigênio, silício, alumínio, ferro, cálcio, sódio, potássio, magnésio e titânio, os outros minerais que compõem o solo originam-se da decomposição destes primários (RAIJ, 1981).

Na maioria dos solos, esta parte da fração sólida representa em torno de 45% do volume total; o espaço poroso, que compreende a fase líquida e gasosa, 50%, e a matéria orgânica, 5% (MOREIRA;SIQUEIRA, 2006).

O ar presente no solo, que compreende a fração gasosa, possui uma composição diferente do ar da atmosfera. A estrutura edáfica dificulta a troca gasosa com a atmosfera, e acrescido da respiração de raízes e micro-organismos, a concentração de CO_2 pode atingir valores acima de 1%, enquanto que na atmosfera

os teores são da ordem de 0,03% (VARGAS; HUNGRIA, 1997). Portanto, a quantidade de água precisa ser contralada, pois um solo encharcado produz condições de anaerobismo.

Estes baixos níveis ou até ausência de oxigênio estimulam o crescimento de micro-organismos anaeróbicos, que ao degradarem a matéria orgânica podem produzir componentes tóxicos e reduzir drasticamente os níveis de micronutrientes fundamentais para o crescimento vegetal, como o ferro e manganês, transformando-os em formas mais solúveis e mais sujeitos a lixiviação (RAIJ, 1981). Além de incentivar as bactérias que realizam a denitrificação, processo em que o nitrito é transformado em nitrogênio que é liberado para a atmosfera, reduzindo os níveis deste elemento no solo. (REIS; TEIXEIRA, 2006).

Compondo a fração líquida, a água do solo é importante para os micro-organismos, além de manter a integridade celular, possibilitar a absorção de nutrientes, permite o movimento dos micro-organismos unicelulares entre os micro-sítios, ou micro-habitats e afeta a aeração e o pH do solo. Além disto, os processos de seca/umidade ajudam na liberação dos substratos adsorvidos na superfície das partículas do solo, estimulando a atividade metabólica (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A água pode ser encontrada adsorvida nas partículas de solo e de matéria orgânica ou livre, sendo que desta forma não se encontra pura, nela estão dissolvidos materiais provenientes dos processos químicos e bioquímicos, sendo chamada de solução do solo (RAIJ, 1981).

Dentre os fatores físicos que mais afetam a comunidade edáfica está a temperatura, que influencia não só as reações fisiológicas celulares, mas também características físico-químicas do ambiente, tais como volume do solo, potencial de oxirredução, pressão, difusão, tensão superficial, estrutura da água, que por sua vez apresentam influencia direta no ambiente microbiano (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Das características químicas, o pH é o que influi mais diretamente na população de micro-organismos do solo, por exemplo, os fungos estão melhor adaptados a valores de pH menores que 5,0, além de serem encontrados em menores incidências que as bactérias e actinomicetos em solos com valores de pH entre 6 e 8, que é a faixa em que estes micro-organismos melhor estão adaptados (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Os solos de clima mais úmidos são mais ácidos devido a lixiviação de substâncias básicas e a decomposição da serrapilheira, além de processos naturais

do solo que aumentam a acidez como, por exemplo, a fixação biológica de nitrogênio. Entretanto, esta característica não é uniforme no solo, as regiões próximas as partículas sólidas, ou até os coloides orgânicos possuem o pH muito menor que o da solução (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

No solo ocorrem fenômenos de natureza química, física ou biológica que afetam os nutrientes que o compõem, tornando-o constantemente em desequilíbrio químico. A mineralização é um destes fenômenos, e consiste na transformação de substâncias orgânicas decomponíveis em formas inorgânicas, as quais são absorvidas pelas plantas e pela microbiota do solo, que é realizada exclusivamente pela população microbiana do solo (LOREAU, 2001).

A capacidade de renovação contínua dos nutrientes tem sido considerada uma característica inata e específica da formação biogeológica chamada solo (VARGAS; HUNGRIA, 1997). Muitos destes nutrientes estão em uma forma não disponível, sendo insuficientes para manter toda a biodiversidade, já que o solo é uma importante fonte para os seres vivos e principalmente para os micro-organismos edáficos que retiram dele quase a totalidade necessária para o seu desenvolvimento. Portanto, espécies que tem acesso a formas abundantes, mas não disponíveis para a maioria das espécies, tem vantagem ecológica. Podemos citar neste caso as diazotróficas e os solubilizadores de fosfato que utilizam como fonte de energia nitrogênio na sua forma gasosa e fósforo, respectivamente (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Por isso, os processos de mineralização e solubilização dos ciclos biogeoquímicos, realizados em sua grande maioria pelos micro-organismos, são importantes, pois eles tornam disponíveis minerais fundamentais para o desenvolvimento da biodiversidade.

O solo não rizosférico possui baixos níveis de substratos orgânicos, além de apresentar um ambiente físico-químico desfavorável para o desenvolvimento de micro-organismos, que podem estar ausentes ou manter-se, em grande maioria, em dormência (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006), gerando um ambiente com baixa disponibilidade de nutrientes. Bactérias Gram positivas são mais abundantes em solos não rizosféricos, provavelmente devido a maior espessura da sua parede celular, o que possibilita uma proteção maior aos estresses, contudo outras bactérias também possuem a capacidade de se proteger, formando cistos, esporos ou alterando a forma celular (MOREIRA;SIQUEIRA, 2006).

É importante para a manutenção da qualidade do solo em agroecossistemas a incorporação de matéria orgânica e a cobertura do solo, a fim de manter níveis aceitáveis de nutrientes e de populações microbianas.

A porção orgânica do solo é composta por uma mistura de materiais mortos, principalmente na forma de húmus, e que compõem cerca de 98% do total de carbono, e materiais vivos que possuem 1 a 5% do carbono, onde 5 a 10% são raízes, 15 a 30% são componentes da macrofauna e 60 a 80% são micro-organismos, e substâncias orgânicas transformadas ou em seu estado original. Estes seres vivos compõe a fração biológica, a principal componente do solo, já que muitas propriedades são decorrentes de atividades da mesma (ARAÚJO; HUNGRIA, 1996).

Geralmente o húmus é composto por carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, enxofre e fósforo (RAIJ, 1981), entretanto a composição química não é definida, visto a multiplicidade de resíduos orgânicos que participam de sua formação.

A matéria orgânica apresenta fortes influências nas características do solo (Fig. 1): ela pode regular o pH, através de reações com os íons livres, havendo o surgimento superficial de cargas negativas e formação de H_2O; aumentar as reações físicas, como retenção e adsorção de água e cátions, devido ao tamanho de suas partículas, variando entre 300 a 700m² g^{-1}; apresenta elevada capacidade de troca de cátions devido a sua natureza de carga negativa; atua como agente cimentante, colaborando na conservação da estrutura e temperatura do solo; além de ser uma importante fonte de nutrientes, liberados através de processos de decomposição (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

As partículas de solo se encontram em agregados, com formas e tamanhos distintos, que decorrem de interações dos seres vivos, matéria orgânica e a fração mineral. A interação entre os micro-organismos e a matéria orgânica gera substâncias denominadas agentes cimentantes, como óxido de ferro ou polissacarídeos de alta viscosidade e substâncias húmicas, proporcionando uma estrutura porosa onde há retenção de água e nutrientes, que encontram-se a disposição dos vegetais, permitindo assim o desenvolvimento destes (RAIJ, 1981). Portanto torna-se fundamental manter esta estrutura, evitando a compactação excessiva.

.

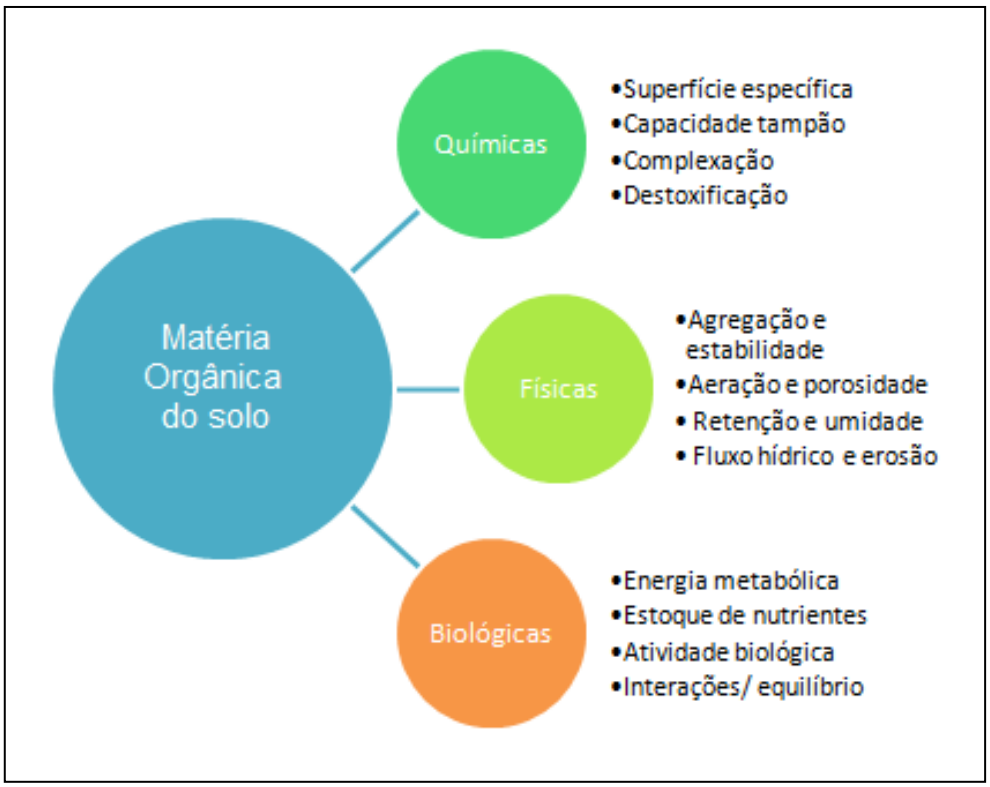

Figura 1. A matéria orgânica como moduladora das propriedades e funções do solo.
Fonte: MOREIRA; SIQUEIRA, 2006, p.257.

Com a formação destes agregados e a presença de água, formam-se os chamados micro-habitats (Fig. 2), estes ambientes são envoltos por um filme de água e servem como proteção para os micro-organismos unicelulares do solo, neles estão presentes enzimas, substratos orgânicos, íons livres e partículas de solo, e tornam-se locais protegidos de alterações bruscas na temperatura, pH, umidade (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A matéria orgânica e os micro-organismos estabilizam a estrutura do solo, que por sua vez protege fisicamente estes dois componentes, formando um ciclo complexo e intimamente ligado, e qualquer alteração neste sistema tem consequências na estrutura e propriedades do solo (VARGAS; HUNGRIA, 1997).

Em um ecossistema equilibrado o teor de matéria orgânica é constante, refletindo o equilíbrio entre a adição de restos orgânicos de seres vivos e a decomposição por mineralização. Alguns substratos demoram a ser degradados ou muitas vezes nem o são, a estes denominamos substâncias recalcitrantes (MOREIRA;SIQUEIRA, 2006), portanto, devemos tomar precauções ao acrescentar tais substâncias ao solo evitando a poluição ambiental.

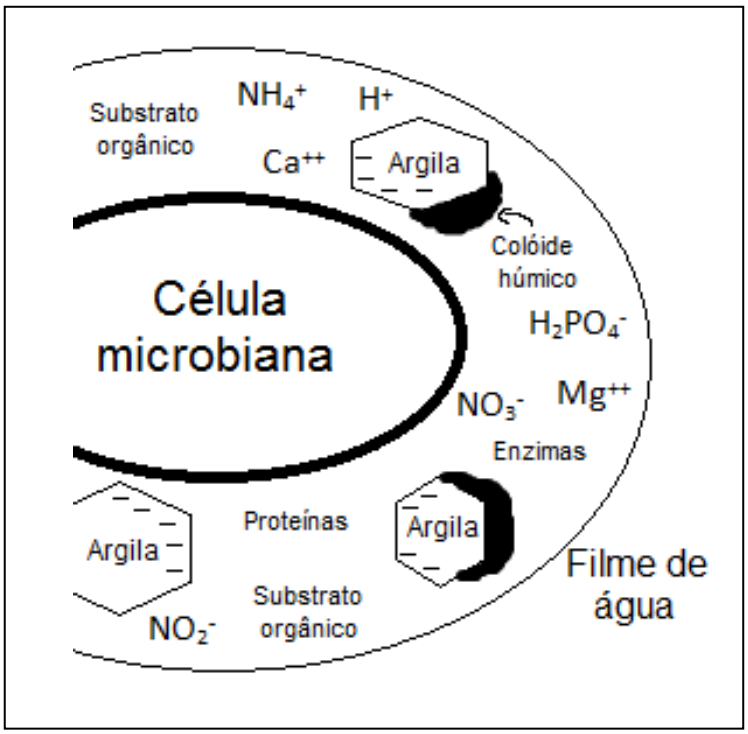

Figura 2. Representação do microambiente de filme de água no solo contendo célula microbiana, argila, coloides orgânicos, cátions orgânicos e inorgânicos adsorvidos e íons repelidos.
Fonte: MOREIRA; SIQUEIRA, 2006, p.124.

Podemos considerar, portanto, que as modificações nas populações microbianas ocorrem principalmente em decorrência de alterações do pH, da umidade, da aeração, da temperatura e da disponibilidade de nutrientes orgânicos e inorgânicos.

Além disto, é a interação entre as quatro fases que o solo apresenta, sólida, líquida, gasosa e biológica, que geram propriedades que possibilitam a retenção de água e nutrientes, tornando-os disponíveis para os vegetais, e permitindo a vida na terra (RAIJ, 1981).

2.1.1 Micro-organismos edáficos

Segundo Moreira e Siqueira (2006), micro-organismos podem ser definidos como “sistemas químicos autônomos capazes de autopropagação” que, obedecendo as leis da física e química, são capazes de converter uma forma de energia em outra através de um conjunto de reações químicas denominadas de metabolismo. Estas reações de transformações são mediadas por absorção de nutrientes e substâncias energéticas, que sustentam o desenvolvimento celular. Estes novos elementos

produzidos viram substrato após a morte da célula microbiana, tornando possível a absorção por outros organismos, estabelecendo-se uma sucessão trófica no ecossistema (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Podem-se determinar como residentes legítimos do solo aquelas espécies de micro-organismos que são encontrados em número relativamente grandes, e cuja ocorrência, número e atividades são controlados pelas condições do solo (VARGAS; HUNGRIA, 1997). A biomassa microbiana do solo é composta por bactérias, fungos e representantes da microfauna, e sua atividade ocorre, de modo geral, entre 0 a 20cm de profundidade, devido aos altos níveis de matéria orgânica e raízes que se acumulam nesta região (MATSUOKA; MENDES; LOUREIRO, 2003).

Podemos classificar os micro-organismos decompositores presentes no solo de duas maneiras, que atuam de modo diferenciado no processo, gerando uma sucessão induzida pelo tipo de substrato, ambiente e alterando a velocidade de decomposição do material orgânico. Estes micro-organismos podem ser zimógenos ou autóctones. Os primeiros possuem um crescimento rápido e geralmente realizam as primeiras reações do processo de decomposição, já os segundos são a população original e frequente do solo, apresentando um crescimento constante mesmo depois da diminuição dos níveis de carbono disponíveis para fonte de energia. Portanto, com a evolução do processo de decomposição, ocorre a sucessão dos primeiros micro-organismos para os segundos, mais especializados, fazendo com que a taxa de decomposição diminua com o tempo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Os inúmeros organismos que habitam o solo são a base da sustentação e produtividade dos ecossistemas terrestres. Considerando os organismos edáficos em geral, as principais atividades realizadas para a conservação das propriedades do solo, resumidamente, são o auxílio à manutenção da porosidade do solo, permitindo a melhor infiltração da água e penetração de raízes; redução do processo de erosão e compactação devido ao favorecimento da estrutura do solo através da excreção de substâncias cimentantes; e decomposição e mineralização de nutrientes, até a formação de húmus (GUNAPALA; SCOW, 1998).

2.2 Ecologia microbiana

As relações e interações entre as diferentes comunidades de organismos do solo contribuem para a manutenção da vida no planeta (ARAÚJO; HUNGRIA, 1994), realizando processos importantes no fluxo de energia e massa.

Devido a sua natureza complexa e dinâmica, o solo torna-se um habitat onde micro-organismos metabolicamente muito distintos interagem em estado de equilíbrio dinâmico(MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Segundo Odum (2004), as interações negativas tendem a predominar em comunidades pioneiras ou em condições de perturbações, com o desenvolvimento dos ecossistemas estas relações tendem a ser minimizadas em favor das interações positivas.

As avaliações de diversidade envolvem o número de micro-organismos presentes em um determinado local, aspectos genéticos (número, riqueza de genomas) e funcionais (variedade de funções de decomposição, transformação de nutrientes, promoção/supressão do crescimento de plantas) (SILVA, 2008).

Assim sugere-se que a determinação da população microbiana seja útil para avaliar a diversidade funcional, investigar a ecologia microbiana e viabilizar indicadores de qualidade do solo (NANNIPIERI et al., 2002).

2.2.1 Diversidade funcional

Na biomassa vegetal é que se encontra o maior reservatório dos principais nutrientes que os seres vivos utilizam, como carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre, e em florestas o aporte de material orgânico passível de decomposição é de 8 t ha^{-1} ano^{-1}, entretanto este material pode levar até 100 anos para ser reciclado por completo. A biomassa microbiana representa um reservatório bem menor, em média, de 2 a 5 % do carbono orgânico, de 1 a 5 % do nitrogênio orgânico e de 2 a 20 % do fósforo orgânico nos solos tropicais (D'ANDRÉA et al.,2002), mas é um compartimento lábil desses nutrientes, com o tempo de reciclagem da ordem de 2 a 6 meses, proporcionando assim, um grande fluxo de carbono e nutrientes no solo, evidenciando a importância dos processos microbianos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Na Fig. 3 encontra-se representado o fluxo e principais transformações do carbono e outros nutrientes relevantes para a vida. Pode-se notar que a matéria orgânica é decomposta e mineralizada pelos organismos do solo que interagem

intensamente entre si, liberando CO_2 através da respiração microbiana e minerais, que são absorvidos pelos vegetais ou perdidos para o meio, ou ainda tornam-se imobilizados na biomassa microbiana, que após sua morte serão liberados para o meio e iram renovar a matéria orgânica ou compor o húmus. Ao final do processo, podemos considerar que cerca de 65% do carbono adicionado ao solo foi utilizado para a respiração, sendo liberado em forma de CO_2 para a atmosfera, 25 a 30% permanecem na biomassa no interior das células e 5 a 10% retidos na fração húmica, completando, assim, o ciclo do carbono no solo. Quanto mais matéria orgânica é acrescentada maior a taxa de decomposição, acelerando o processo de liberação de nutrientes (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

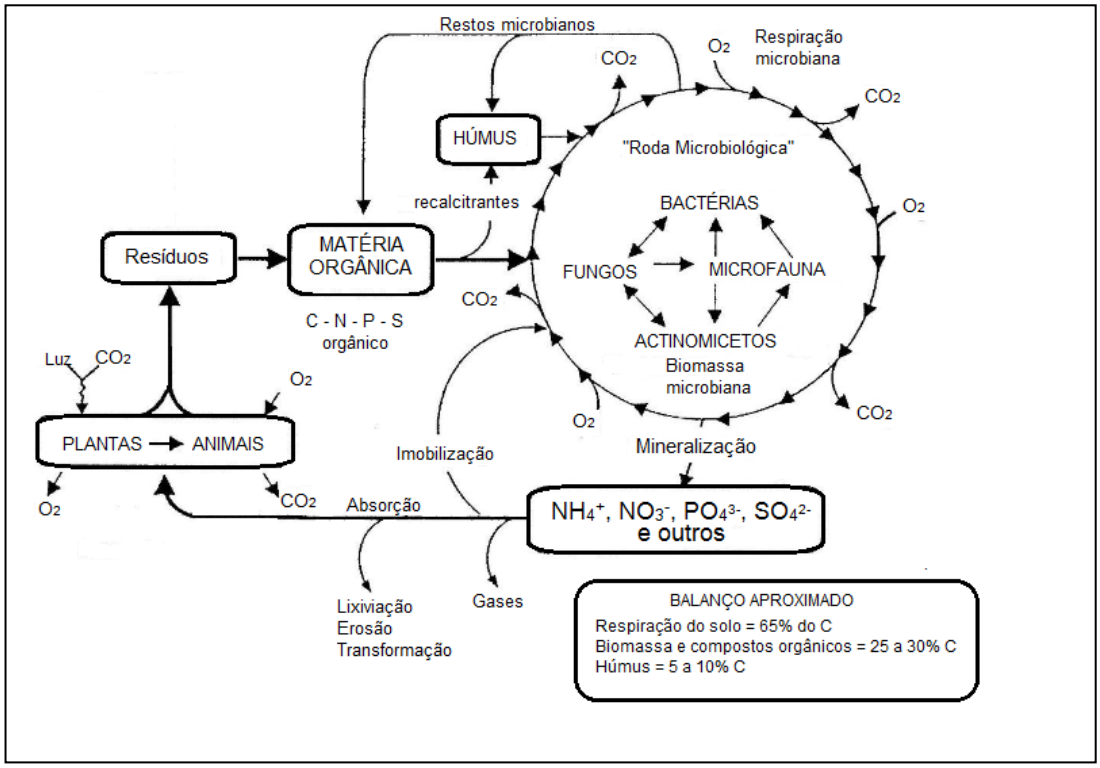

Figura 3. Fluxo e principais transformações dos nutrientes carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre.
Fonte: MOREIRA; SIQUEIRA, 2006, p.182.

A microbiota edáfica é a principal fonte de enzimas, sendo assim, considerada a grande catalisadora das transformações bioquímicas do solo. Os grupos funcionais pesquisados no presente trabalho participam nos ciclos de três importantes nutrientes: carbono, fósforo e nitrogênio. Na tab. 1 estão relatados os principais processos e mecanismos de transformações bioquímicas que regulam a ciclagem dos elementos em questão.

Tabela 1. Principais processos e mecanismos de transformações bioquímicas que regulam a ciclagem dos elementos.

Elemento	Processo	Mecanismo	Importância para
C	Fotossíntese	Incorporação de C e energia	Atividade microbiana do solo
	Decomposição	Lise macromolecular	Formação de húmus no solo
	Mineralização	Liberação de CO_2 e nutrientes	Fertilidade do solo e gases do efeito estufa
N	Amonificação	N orgânico -> NH_3	Aumenta a disponibilidade
	Imobilização	NH_4^+ e NO_3^- -> N orgânico	Reduz a disponibilidade
	Nitrificação	NH_4^+ -> NO_3^-	Facilita a lixiviação
	Desnitrificação	NO_3^- -> N_2O, N_2	Perdas de N na forma gasosa
	Fixação biológica	N_2 -> NH_3 -> N orgânico	Incorporação de N nos seres vivos
P	Mineralização	P orgânico -> PO_4^{-3}	Aumenta a disponibilidade
	Imobilização	PO_4^{-3} -> P orgânico	Reduz a disponibilidade
	Solubilização	P insolúvel -> PO_4^{-3}	Aumenta a disponibilidade

Fonte: MOREIRA; SIQUEIRA, 2006.

A celulose é o políssacarídeo mais abundante no meio ambiente, representando a maior parte do CO_2 fixado nas plantas, é insolúvel em água e é considerada como uma das únicas fontes renováveis de carbono (CURY; NOGUEIRA, 2007).Este elemento é hidrolisado enzimaticamente por um complexo denominado celulase, que é a ação sinergística de endoglucanases e exoglucanases sintetizadas por micro-organismos (COÊLHO, et al., 2008). Os micro-organismos celulolíticos rompem a molécula de celulose em celobiose, um dissacarídeo (glicose+glicose), e uma molécula de glicose livre, que podem ser utilizadas como fonte de energia pelos demais organismos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Este é um processo lento e depende da concentração, localização e mobilidade das celulases e micro-organismos celulolíticos (CURY; NOGUEIRA, 2007).

Nem todo micro-organismo produtor de celulase pode ser considerado celulolítico, pois a produção desta enzima depende das relações destes com outros seres vivos e com as condições climáticas. Estes micro-organismos são fortemente influenciados pela cobertura vegetal do local onde se encontram, já que

determinados exsudatos e tecidos radiculares destacados podem estimula-los ou inibi-los (COÊLHO et al., 2008).

Segundo Moreira e Siqueira (2006), os fungos são os principais celulolíticos quando o solo apresenta-se úmido, quando as condições são mais secas as bactérias passam a ser as principais decompositoras.

Sanomiya e Nahas (2003) constataram que a freqüência de populações de bactérias com atividade enzimática encontrada em solos com diferentes plantas ocorreu na seguinte ordem decrescente: proteolíticas > lipolíticas > amilolíticas > pectolíticas > celulolíticas.

O fósforo, depois do nitrogênio, é o nutriente inorgânico mais necessário no meio ambiente, tendo em vista sua atuação estrutural, funcional, e na transferência de energia (BARROTI; NAHAS, 2000), sendo um fator limitante para o desenvolvimento vegetal e animal, por fazer parte de biomoléculas como os ácidos nucléicos e ATP (FERNÁNDEZ et al., 2005).

O fósforo é um elemento de baixa mobilidade no solo, e como reflexo são baixos os teores deste mineral na solução do solo, raramente atingindo 0,1 ppm (partes por milhão) (RAIJ, 1981). A matéria orgânica é uma importante fonte deste mineral, contendo geralmente de 15 a 80% do fósforo total encontrado no solo, além disto, o húmus gerado após a decomposição da matéria orgânica protege o fósforo, evitando sua fixação (CARNEIRO, et al., 2004).

Alguns micro-organismos do solo possuem a capacidade de solubilizar fosfatos naturais, chamados de micro-organismos solubilizadores de fosfato, e que desempenham importante papel no ciclo biogeoquímico do fósforo (CARNEIRO et al., 2004). O ciclo do fósforo é aberto, fluindo das rochas para o fundo dos oceanos, tendo maior atividade entre a biota e o solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Estes micro-organismos disponibilizam fosfato solúvel além das suas necessidades, que é aproveitado pelas plantas (BARROTI; NAHAS, 2000). De acordo com Nahas, Centurion e Assis, (1994) “bactérias, fungos e actinomicetos, envolvidos nos processos de solubilização do fósforo inorgânico, excretam ácidos orgânicos que atuam dissolvendo diretamente o material fosfático” liberando ortofosfatos solúveis passíveis de absorção por vegetais e outros micro-organismos.

Micro-organismos solubilizadores de fosfato são bastante comuns entre os residentes do solo. Já foram isolados de diferentes solos bactérias que exercem esta funçãopertencentes aos gêneros *Pseudomonas, Bacillus, Rhizobium, Agrobacterium,*

Burkholderia, Achromobacter, Microccocus, Aerobacter, Flavobacterium e *Erwinia* (FERNÁNDEZ et al., 2005). Dos solos de cerrado brasileiro já foram isoladas bactérias dos gêneros *Arthobacter, Flavobacterium, Streptomyces* e *Streptoverticillium* com atividade para fosfatases (VARGAS; HUNGRIA, 1997). Tais micro-organismos também são capazes de promover o crescimento vegetal mediante a solubilização de fosfatos inorgânicos (FERNÁNDEZ et al., 2005).

Deve-se ressaltar que apesar de ser pouco reativo no solo, o fósforo quando alcança corpos de água exerce um grande impacto ambiental, pois é o principal agente da eutrofização, portanto, o uso de adubos químicos deve ser evitado, visto que tal prática facilita a lixiviação deste e de outros elementos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

O nitrogênio é abundante na natureza, constituindo quase 80% do gás atmosférico, mas devido a tripla ligação que existe entre os seus dois átomos, nenhum animal ou planta é capaz de utilizá-lo como fonte de nutrição (ARAÚJO; HUNGRIA, 1994), contudo este nutriente é fundamental para o crescimento vegetal. Os teores de nitrogênio nos solos do Brasil, de um modo geral, não são elevados e geralmente se situam na faixa de 0,05% a 0,30% da composição química total (ARAÚJO; HUNGRIA, 1994).

O nitrogênio ocorre principalmente em combinações orgânicas. Contudo, são as formas inorgânicas que são disponíveis para os vegetais (ARAÚJO, 2008). De todos os elementos que circulam entre o sistema solo – planta – atmosfera, o nitrogênio é o que sofre o maior número de transformações bioquímicas no solo.

O ciclo do nitrogênio é dividido em três subciclos, o subciclo elementar, que é representado pela desnitrificação e a fixação biológica, e é a ligação entre a biota e os componentes da atmosfera; o subciclo das plantas, através da absorção e formação de compostos orgânicos nitrogenados como substratos primários para os micro-organismos heterotróficos, que compõem o terceiro subciclo, caracterizado pela mineralização, dissipação de energia da matéria orgânica e produção de formas inorgânicas de nitrogênio no solo.

Há um grupo de micro-organismos que realizam o processo de transformação do nitrogênio atmosférico em uma forma assimilável pelas plantas, a estes é dado o nome de bactérias fixadoras de nitrogênio, que realizam o processo de fixação deste elemento através de relações simbióticas com os vegetais (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995). As bactérias fixadoras de nitrogênio

podem ser divididas, basicamente, em dois grupos, as endofíticas obrigatórias e as facultativas, onde, respectivamente, um grupo não sobrevive bem no solo, mas coloniza o interior da raiz e a parte aérea da planta, e o outro coloniza a superfície e interior da raiz e sobrevive bem em solo (BALDANI et al., 1997).

Durante a década de 90, novas bactérias fixadoras de nitrogênio foram isoladas e identificadas, incluindo espécies do gênero *Azospirillum, Herbaspirillum, Acetobacter e Azoarcus*, sendo a maior parte destas bactérias isoladas de regiões tropicais, especialmente no Brasil (BALDANI et al., 1997).

As enzimas catalisam reações no interior das células, mas muitas podem ser liberadas para o meio após a lise celular e continuar exercendo suas funções, ou ainda serem programadas para serem excretadas e degradarem substratos estruturalmente muito grandes para serem transportados através da membrana celular e metabolizado (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). As enzimas podem contribuir na descontaminação de solos pela degradação de poluentes orgânicos ou imobilização de metais pesados (NANNIPIERI et al., 2002).

Portanto, toda enzima presente no solo é produzida por organismos vivos do solo, e práticas que os favorecem, como as práticas adotadas pela agricultura de base ecológica, também favorecem a atividade enzimática (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Com base nisto pode-se verificar que a diversidade microbiana tem efeito positivo na eficiência de ciclagem de nutrientes, controla os processos do ecossistema (produtividade e biomassa de grupos funcionais) e contribui para o incremento de processos ecológicos no ecossistema, mostrando estar diretamente ligada à qualidade do solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Losekann (2009) destaca a importância das análises de diversidade funcional, pois somente com base nas alterações de diversidade genética não é possível inferir se determinadas funções do solo foram perdidas ou não. Além de que os micro-organismos estão diretamente envolvidos nos ciclos dos nutrientes no solo, e aliada à quantificação de bactérias, a avaliação de determinados grupos microbianos dá indicação de como os processos bioquímicos estão ocorrendo.

2.3 Bioindicadores de qualidade do solo

Estudos sobre a qualidade do solo são relativamente recentes, e não há consenso entre os pesquisadores a respeito de seu conceito, contudo, o mais aceito na ciência foi proposto por Doran e Parkin em 1994, que considera qualidade do solo como a capacidade deste de funcionar dentro dos limites do ecossistema para sustentar a produtividade biológica, manter a qualidade ambiental e promover a saúde de plantas e animais.

Definir a qualidade do solo não é uma tarefa fácil. A multiplicidade de fatores que controlam os processos biogeoquímicos e suas variações em função de tempo e espaço, aliados a complexidade do solo dificulta esta tarefa (MENDES et al., 2009). Portanto, não é possível ser mensurada diretamente, mas pode ser estimada a partir de indicadores (ARAÚJO, 2008).

Indicadores são características mensuráveis (quantitativas ou qualitativas) que participam de um processo ou atividade e que permitem caracterizar, avaliar e acompanhar as alterações ocorridas num dado ecossistema (BERTINI, 2010).

Um indicador de qualidade do solo deve correlacionar-se com os processos naturais do ecossistema; ser relativamente de fácil utilização em campo; ser suscetível a variações climáticas e de manejo; ser componente, quando possível, de uma base de dados (DORAN; PARKIN, 1994).

Os micro-organismos, portanto, tornam-se excelentes bioindicadores, pois se relacionam com as propriedades físicas e químicas do solo e estão suscetíveis a quaisquer alterações neste sistema, além de serem relativamente fáceis de mensurar, sendo a avaliação através de cultura em placas um método de fácil acesso e satisfatório. Segundo Losekann (2009), a contagem de micro-organismos no solo, apesar de ser vista com ressalvas, ajuda a entender os processos que nele ocorrem e pode servir como indicador do impacto de diversas atividades antrópicas.

FIALHO et al. (2006) avaliando áreas sob vegetação natural e cultivos de bananeiras na Chapada do Apodi (CE), encontraram que o uso agrícola causa alterações ambientais que reduzem a população e a atividade microbiana, tendo como consequência a redução de sua qualidade, quando comparado à área sob mata natural.

Silveira, Melloni e Pereira (2004) trabalhando com atributos microbiológicos e bioquímicos como indicadores da recuperação de áreas degradadas, no sul de Minas Gerais, empregaram a análise da densidade de fungos e bactérias, micro-

organismos solubilizadores de fosfato, carbono da biomassa, atividades microbianas e pH, e permitiu concluir que estes atributos são bons indicadores da recuperação de solos de áreas degradadas. Além disso, permitiu comprovar que a recuperação dessas áreas está fortemente limitada por parâmetros microbiológicos e bioquímicos do solo.

Os atributos microbiológicos têm sido amplamente discutidos na literatura como indicadores de qualidade (PEREIRA; NEVES; DROZDOWICZ, 1996; D'ANDRÉA et al., 2002; FACCI, 2008; LOURENTE et al., 2008; LISBOA, 2009; LOSEKANN, 2009; BERTINI, 2010).

Todavia, tanto índices quanto características consideradas até o momento como indicadores, ainda não abrangem e desvendam a complexidade do sistema edáfico dos diferentes ecossistemas, de modo a atender a definição de qualidade do solo.

De modo geral, os sistemas naturais sem interferência antrópica proporcionam grandes benefícios ao ecossistema, particularmente ao solo, reduzindo a compactação e a erosão, uma vez que o impacto da chuva é atenuado pelo extrato arbóreo e pela camada orgânica formada sobre a superfície do solo, dando condições ideais de sombreamento e menor oscilação de umidade e temperatura para o crescimento da população microbiana do solo (VARGAS; HUNGRIA, 1997).

2.4 Manejo ecológico do solo

A cobertura vegetal do Brasil tem sido intensamente modificada, e assim como em todos os ecossistemas, a Floresta Estacional Semidecidual, encontrada na área de mata nativa avaliada neste estudo, sofre com alterações significativas decorrentes do desmatamento e remoção da madeira e a posterior utilização do solo para produção agrícola (BORGES et al., 2009).

As ações humanas podem causar modificações significativas nas propriedades do solo, seja pela adição de elementos tóxicos através de atividades industriais e mineradoras, seja pelas práticas de cultivo, que terão impacto direto na comunidade biológica. Nos últimos 25 anos já foi degradado, aproximadamente, 24% do solo mundial (HAYNES, 1999).

Para muitos sistemas de manejo agrícola o solo é considerado somente um suporte físico para as plantas, dessa forma utilizam práticas destrutivas, como por exemplo, calagem corretiva, aração profunda, adubação nitrogenada (PRIMAVESI, 2008), que aceleram a decomposição da matéria orgânica e consequentemente a perda da microbiota edáfica, ignorando a dinâmica ecológica dos agroecossistemas e gerando perda gradual da fertilidade do solo. Tais práticas visam maximizar a produção e os lucros levando a uma situação de insustentabilidade, pois demandam um alto custo energético, além de gerarem impactos negativos no ser humano e no entorno social (GLIESSMAN, 2000).

É possível notar que após a modernização da agricultura, com maquinário pesado, insumos agrícolas, ocorrido principalmente a partir dos anos 50, houve a desvalorização dos processos naturais e biológicos na construção do solo (SOUZA; RESENDE, 2006).

Pode-se citar uma série de consequências negativas do modelo agroquímico de produção, dentre as quais se destacam a compactação do solo; a eliminação, inibição ou redução sensível da flora microbiana edáfica; o declínio da produtividade pela degradação do solo e perda da matéria orgânica; e a poluição alimentar, da água, do solo, do ar, em consequência dos agrotóxicos e adubos minerais solúveis (SOUZA; RESENDE, 2006).

Sempre que os manejos agrícolas são realizados minimizando os impactos nas características locais do ambiente, o potencial natural dos solos é aproveitado. Para a agricultura de base ecológica, o solo é um recurso vivo e autorrenovador, portanto é necessário obter e manter as suas qualidades físicas, químicas, biológicas e hidrológicas (PULLEMAN et al. 2008).

De acordo com a definição de agricultura ecológica, podem-se identificar como alguns dos objetivos: desenvolver e adaptar tecnologias as condições sociais, econômicas e ecológicas de cada região; trabalhar a propriedade dentro de um enfoque sistêmico; estimular a atividade biológica do solo; buscar o máximo de equilíbrio ecológico possível dentro das unidades de produção; e preservar o solo, conservando suas propriedades físicas, químicas e biológicas.

A superação da visão de que a fertilidade do solo é reflexo da quantidade de nutrientes presentes no mesmo, se fundamenta em alguns princípios ecológicos estreitamente relacionados à dinâmica biológica dos solos (PETERSEN; ALMEIDA, 2008).

Com base nestes princípios o sistema de produção ecológica utiliza-se de métodos que assegurem condições ambientais propícias tais como: rotação de culturas, adubação verde, manutenção do solo permanentemente coberto, aplicação de pós de rocha, minimização ou ausência da aração, aplicação de húmus provenientes da propriedade em questão (PETERSEN; ALMEIDA, 2008).

A função do composto orgânico, ou húmus, adicionado ao solo nas práticas agrícolas não é nutrir as plantas diretamente, mas sim os organismos do solo. São esses organismos, em grande parte, que compõem a microbiota, que mobilizam os nutrientes minerais para em seguida deixá-los disponíveis para os vegetais (PRIMAVESI, 2008), portanto a matéria orgânica e organismos do solo atuam como um reservatório temporário, liberando os nutrientes aos poucos e em proporções balanceadas para as culturas (PETERSEN; ALMEIDA, 2008). Com este enfoque, levam-se em consideração processos naturais, como por exemplo, a fixação biológica de nitrogênio, a solubilização de fosfatos naturais, a ciclagem de nutrientes e a participação da microbiota edáfica nestes processos.

Para que um agroecossistema se mantenha ativo e produtivo é necessário manter a estabilidade que provem dos sistemas naturais, onde a diversidade de espécies, teias alimentares complexas e o fluxo de energia e massa entre os organismos e entre estes e o ambiente são os principais componentes, metas que devem ser buscadas para uma agricultura mais sustentável (ALTIERI, 2002).

Val-Moraes et al. (2008) compararam a diversidade genética de um cultivo comercial de hortaliças e uma área de mata nativa no Cerrado, e constataram a existência de uma maior diversidade genética na área de cultivo em relação a mata. Consideraram isto devido à área de mata nativa apresentar um sinergismo maior e diversidade menor quando comparada com área sob cultivo de hortaliças, cujo ecossistema sofreu alterações, aumentando a sua dinâmica populacional e conseqüentemente o aumento da diversidade bacteriana.

Lourente et al. (2008), compararam a atividade microbiológica em diversos sistemas de cultivos, entre eles: 1) uma mandala (metodologia de produção amplamente usada em sistemas ecológicos) contendo feijão guandu na faixa mais externa e diversas hortaliças (alface, couve e beterraba) mais internamente na mandala, 2) feijão tipo Carioca, em monocultivo sob sistema convencional de preparo do solo, 3) reflorestamento com diversas espécies nativas do Cerrado, estabelecido há 2 anos, 4) cultivo de eucalipto, com 2 anos de implantação e como

padrão comparativo um sistema sob vegetação natural do Cerrado. De acordo com os resultados foram observados maiores teores de carbono da biomassa microbiana do solo e maiores índices de respiração basal na vegetação nativa e no sistema de cultivo de hortaliças, sendo estes sistemas que são caracterizados por um alto aporte de material orgânico, porém de origens diferentes (LOURENTE, 2008). Estes resultados podem estar relacionados a uma maior diversidade microbiológica destes sistemas.

Diversos trabalhos também já foram realizados em manejos ecológicos a fim de avaliar sua qualidade. Duarte e Fávero (2008) apontaram que este tipo de manejo contribui para melhorar a saúde dos solos já que propicia aporte de material orgânico de forma continuada e diversificada, fortalecendo a diversidade de micro-organismos. Além disto, este mesmo estudo demonstrou que estes eram mais porosos e mais macios do que os terrenos a pleno sol, características essas que se refletiam na maior capacidade de retenção da umidade, inclusive em período seco, aspecto fundamental para os micro-organismos edáficos. Em estudos comparando a produção ecológica de algodão, tomando como referência o ecossistema natural, no caso à caatinga, propriedades físicas, químicas e biológicas do solo foram avaliadas em diferentes épocas do ano. Pelos resultados obtidos o solo manejado apresentava uma qualidade semelhante a natural e, em algumas situações, ainda melhor (OTUTUMI, 2004; SOUSA, 2006; LIMA et al., 2007).

De acordo com os dados expostos a cima pode-se supor que manejos ecológicos do solo, independente das culturas utilizadas, mantêm uma alta diversidade microbiana e índices satisfatórios de qualidade do solo. Podemos notar, no entanto, que poucos estudos relacionando a diversidade microbiológica e a qualidade do solo em manejos orgânicos são realizados nas características edafoclimáticas do Rio Grande do Sul, principalmente da Região Sul, portanto este trabalho deseja relacionar estas questões para a região de Pelotas/RS.

3 Material e métodos

3.1 Área de estudo

O presente estudo foi realizado na Estação Experimental Cascata (EEC) da EMBRAPA Clima Temperado, no município de Pelotas/RS. A EEC localiza-se nas coordenadas aproximadas de 31º 37’ S, 52º 31’ W a 32 km da cidade de Pelotas, na face leste da Serra do Sudeste, a 160 m de altitude (CARDOSO; SCHWONKE; NACHTIGAL, 2011). A EEC foi criada em 1938 e é voltada para pesquisa em sistemas de produção de base ecológica.

Como áreas amostrais foram utilizadas: área 1 - fragmento de mata nativa (Fig. 4); área 2 - campo em *pousio* por três anos (em recuperação ambiental) (Fig.5); e área 3 - cultivo de hortaliças manejado dentro dos princípios orgânicos durante sete anos (Fig. 6).

Figura 4. Fragmento de mata nativa (Área 1).

Figura 5. Campo em *pousio* (Área 2).

Figura 6. Canteiros de produção de hortaliças sob manejo ecológico (Área 3).

A vegetação natural de Pelotas é classificada como Floresta Estacional Semidecidual que é tipologia vegetal contida na “Área de domínio da Mata Atlântica” (SCHAFFER; PROCHNOW, 2002).

O clima da região é o Subtropical Úmido, possuindo mínimas entre 10ºC e 15ºC (ROSA, 1985). A umidade relativa atinge um valor médio anual de 80,6% (BAGER et al, 2005).

3.2 Coleta, armazenamento e preparação das amostras

As duas coletas de amostras de solo foram realizadas nos meses de abril e junho de 2012, evitando períodos de chuva excessiva. Antes da coleta foi retirada a serrapilheira e todo material orgânico da superfície do solo.

Para as áreas de campo e de floresta nativa foram demarcados sítios amostrais de 15m² (5mx3m), sendo retiradas nove subamostras de 0 a 20cm de profundidade em duas linhas transversais ligando os quatro cantos da área amostral formando um “X” (Fig. 7).

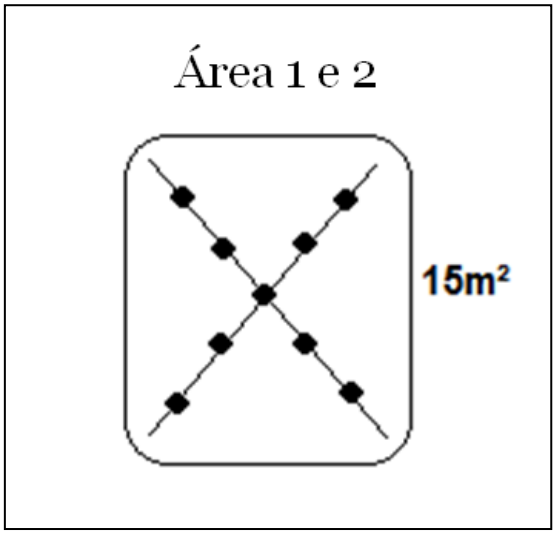

Figura 7. Distribuição das nove subamostras nas áreas amostrais: fragmento de mata nativa (área 1), campo em *pousio* (área 2).

Para as áreas de cultivo foi utilizada a metodologia proposta por Nicolodi, Anghinoni e Salet (2002) que consiste em retirar amostras em transectos demarcados ao longo das linhas de plantio, totalizando nove subamostras de 0 a 20cm de profundidade (Fig. 8).

Todas as subamostras foram homogeneizadas, acondicionadas em sacos plásticos devidamente identificados, totalizando uma amostra por sítio, e posteriormente levadas ao laboratório de Microbiologia Ambiental do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas para o processamento.

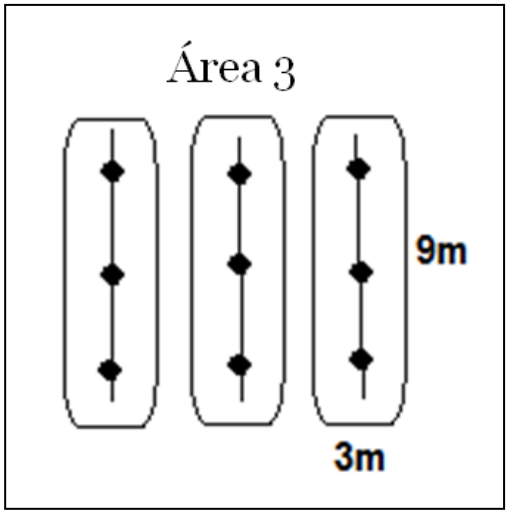

Figura 8. Distribuição das nove subamostras na área de canteiros de cultivo ecológico de hortaliças (área 3).

Em laboratório, o solo de cada amostra foi espalhado em bandejas para a retirada de materiais estranhos (raízes, pedaços de madeira, folhas), como mostra a Fig. 9.Foi peneirado com peneira de 2mm de malha, permanecendo protegidas da luz, calor e umidade excessiva, até a avaliação, a ser realizada no prazo máximo de três dias. Para determinação de umidade, foram utilizados 100g de solo de cada área, sendo armazenado em estufa a 30°C e pesado todos os dias até estabilizar a perda de água.

Figura 9. Homogeneização e retirada de materiais estranhos de amostra de solo.

Após, foi realizado o procedimento de diluição em série, que consiste em diluir 10g de solo em 90ml de solução salina (0,85% NaCL) estéril, mantendo sob agitação por 40min em mesa agitadora a 170rpm, em seguida utilizando-se para a diluição seriada 1ml da solução obtida em 9ml de solução salina estéril (diluição 10^{-1}). O procedimento de diluição foi repetido até obter diluição 10^{-7} (Fig. 10).

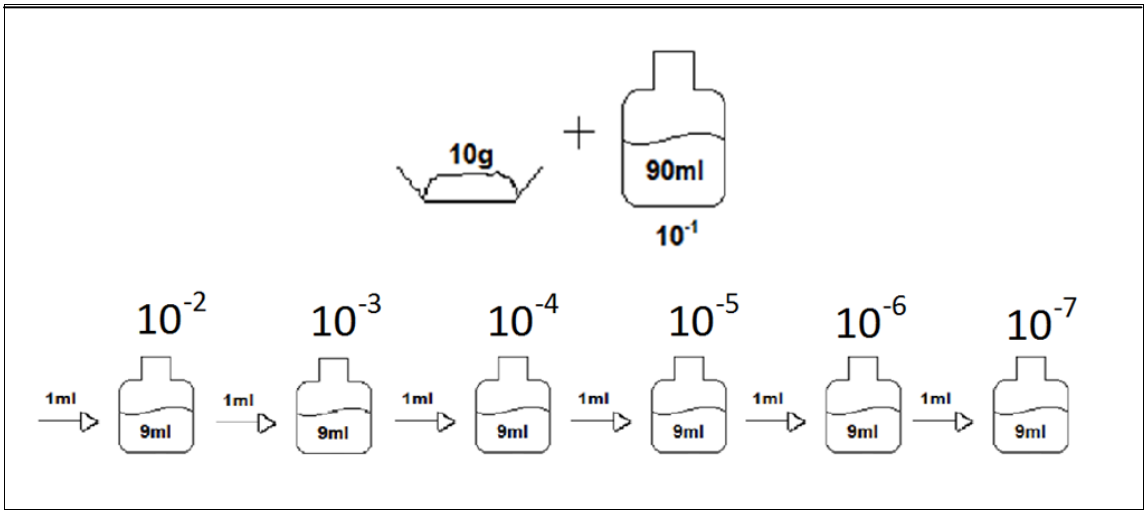

Figura 10. Diluição seriada de amostra de solo.

3.3 Análise microbiológica

3.3.1 Total de bactérias aeróbias

Para o crescimento de bactérias aeróbias foi utilizado o Meio Luria-Bertani, cuja composição de $g.L^{-1}$ é: 10,0 Triptona; 5,0 Extrato de levedura; 10,0 NaCl; 15,0 Ágar; em água destilada; pH 7,0. O meio foi autoclavado a 120ºC por 15min, e vertido em placas de Petri, inoculando-se 0,1ml das diluições 10^{-4} até 10^{-6}. Para cada diluição foram realizadas cinco repetições.

As placas foram incubadas, a 27ºC, por 48h antes da primeira contagem, realizando-se contagens diárias até estabilização do crescimento, que ocorreu após o terceiro dia. A contagem da população de bactérias foi realizada através da técnica de contagem de placas, calculando-se a média de cinco repetições por diluição.

3.3.2 Bactérias produtoras de celulase

As mesmas diluições citadas no item 3.3.1 foram inoculadas em placas de Petri contendo o meio Luria-Bertani acrescido de 0,2% de carboximetilcelulose, incubadas, a 27°C, por 48h antes da primeira contagem, realizando-se contagens diárias durante três dias quando foi obtida a estabilização do crescimento.

Após estabilização do crescimento, as placas foram imersas em solução de vermelho congo (1mg mL^{-1}) por 30min. Lavadas com solução de NaCl 1M (REINHOL-HUREK et al.,1993). Foram consideradas positivas as colônias que formaram, ao redor de si, um halo transparente que corresponde à celulose degradada (Fig. 11). A contagem da população de bactérias positivas foi realizada através da técnica de contagem de placas, calculando-se a média de cinco repetições por diluição.

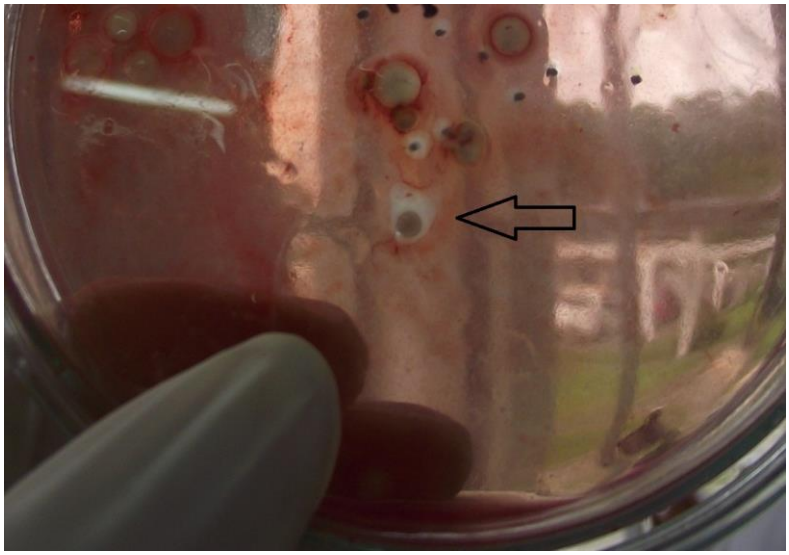

Figura 11. Placa de Petri contendo colônia com halo transparente em seu redor indicando produção de celulase.

3.3.3 Bactérias solubilizadoras de fosfato

A fim de identificar bactérias solubilizadoras de fosfato, 0,1ml das diluições 10^{-4} até 10^{-6} foram inoculadas em placas de Petri contendo o meio de cultura para solubilizadores de fosfatos, meio nutritivo GES (glicose-extrato de solo- sais inorgânicos) com composição g.L^{-1} de: 15,0, fosfato tricálcico, 10,0 glicose; 100,0 extrato de solo; 0,001 KNO_3; 0,2 de $MgSO_4.7H_2O$; 0,02 de $CaCl_2.H_2O$; 0,1 NaCl; 2,0 mL solução de micronutrientes, composta por 0,2g molibdato de sódio, 0,235g

sulfato de manganês, 0,28g ácido bórico, 0,08g sulfato cúprico, 0,024g sulfato de zinco, e 200ml de água destilada; 4,0 mL de Fe-EDTA; 16,0 ágar; 1000mL água destilada; pH 7,0-7,2. O meio foi autoclavado a 120ºC durante 15min e distribuído nas placas de petri.

As placas foram incubadas por sete dias a 27°C, após este período foram contadas as colônias que formaram ao redor de si um halo transparente de solubilização do fosfato inorgânico que foi adicionado ao meio de cultura (Fig. 12), que o torna branco e opaco (precipitado de fosfato insolúvel de cor leitosa ao meio agarizado). A contagem da população de bactérias positivas foi realizada através da técnica de contagem de placas, calculando-se a média de cinco repetições por diluição.

Figura 12. Placa de Petri contendo colônias com halo transparente ao seu redor indicando solubilização do fosfato encontrado no meio de cultura.

3.3.4 Bactérias diazotróficas

Para o isolamento de diazotróficos presentes no solo, foram utilizadas diluições seriadas de 10^{-2} a 10^{-7}. De cada uma das diluições, alíquotas de 0,1ml foram inoculadas em triplicata, em frascos contendo 5mL dos meios semi-sólidos livres de nitrogênio, NFb para avaliação da presença do gênero *Azospirillum brasilense* e *A. lipoferum*, JNFb para *Herbaspirillum* spp., JMV para *Burkholderia,* LGI para *A.*

amazonense e LGI-P para *Gluconacetobacter* spp., conforme descrito em Döbereiner, Baldani e Baldani (1995).

Os frascos foram incubados a 27°C por sete dias, sendo considerados positivos para contagem os que apresentaram uma película aerotáxica típica próxima da superfície do meio (Fig. 13). A contagem da população de bactérias diazotróficas foi realizada através da técnica do Número Mais Provável (NMP), utilizando a tabela de McCrady para três repetições por diluição (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI,1995).

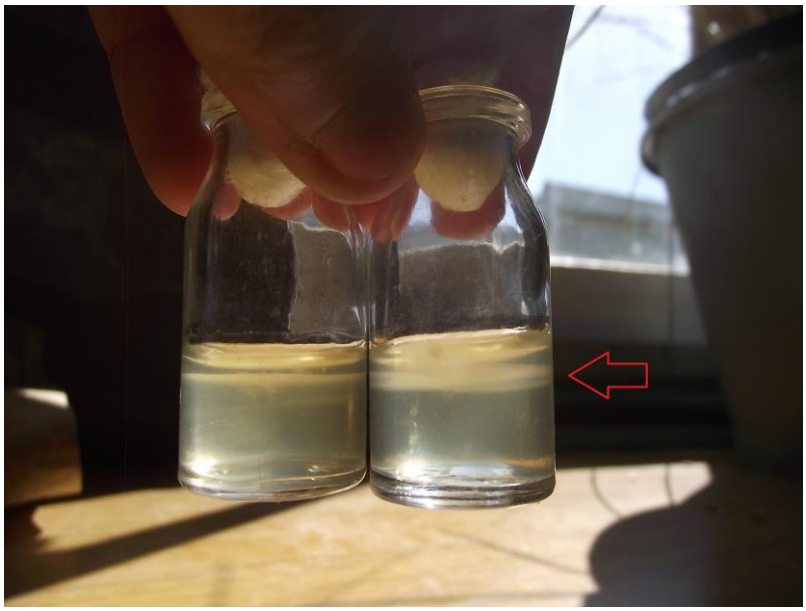

Figura 13. Frascos apresentando película aerotáxica encontrada em meio semi-sólido indicando a presença de bactérias fixadoras de nitrogênio.

3.3.5 Total de fungos

Para avaliação da população de fungos utilizou-se o meio Martin's-Bengala Agar, com composição g/L de: 10,0 glicose; 5,0 peptona; 1,0 KH_2PO_4; 0,5 $MgSO_4.7H_2O$; 0,3 mL rosa-bengala 1%; 15,0 ágar; 1000 mL água destilada; pH corrigido para 5,5; e vertido em placas de Petri.

Foram então retirados 0,1ml das diluições seriadas de 10^{-2} a 10^{-4} e inoculado nas placas de Petri, estas foram levadas a estufa e incubadas por aproximadamente 4 a 5 dias a 27° C, sendo realizada a contagem de colônias todos os dias. A

contagem da população de fungos foi realizada através da técnica de contagem em placas, calculando-se a média de cinco repetições por diluição.

3.4 Análise estatística

Os resultados obtidos na análise microbiológica em cada área foram submetidos à análise de variância e as médias das contagens de micro-organismos comparadas entre si pelo Teste de Tuckey a 5% de probabilidade de erro, utilizando-se o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2003).

4 Resultados e discussão

4.1 Primeira coleta

É importante ressaltar que em estudos de microbiologia do solo, são relativamente comuns variações altas nos resultados, pelo número de fatores que podem influenciar os micro-organismos. Tratando-se de um experimento de campo, esse efeito pode ser ainda mais pronunciado (FACCI, 2008).

Foi possível verificar que nos três grupos avaliados as áreas de mata nativa e campo em *pousio* não diferiram estatisticamente entre si (tab. 2).

Tabela 2. Número de micro-organismos (log_{10}) relacionados às três áreas amostrais obtidos na primeira coleta. Média de cinco repetições.

Áreas	Bactérias aeróbias ($UFC.g^{-1}$)	Fungos (UFC.g-1)	Produtores de celulase (UFC.g-1)
Mata	5,75b*	4,12a	4,55a
Campo	5,96b	3,97a	4,68a
Cultivo	6,34a	3,55b	3,17b
CV (%) = 3,56			

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

Pereira, Neves e Drozdowicz (1999) avaliaram a dinâmica das populações bacterianas em uma área de vegetação nativa e uma área de cultivo de soja obtidas no campo experimental da Embrapa- Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG, no bioma Cerrado. No solo com vegetação nativa, a maior densidade foi obtida para populações de bactérias totais, com $1,51 \times 10^6$ UFC/g de solo seco. No presente estudo as populações na área sob vegetação

nativa alcançaram $5,92x10^5$ $UFC.g^{-1}$, sendo o menor valor observado em relação às outras áreas.

Os valores obtidos na avaliação da área de mata nativa e campo podem ser resultantes do equilíbrio microbiológico encontrado nestes locais, visto que estes há muito tempo não sofrem ações antrópicas. Este equilíbrio populacional surge devido a alta diversidade microbiológica encontrada, sendo determinado por diversos processos e interações que modificam as condições dos microambientes ocupados pelos micro-organismos que, por conseguinte, alteram as densidades das diversas populações na comunidade (Siqueira et al.,1994).

Em solos de agroecossistemas, as mudanças físicas e químicas são mais frequentes, diminuindo assim o efeito do equilíbrio microbiológico sobre as populações, possibilitando números maiores de determinados grupos.

Pode-se notar que os resultados obtidos neste trabalho em relação a bactérias e fungos na área de mata nativa, diferem dos obtidos por Souto (2002), que ao quantificar a população destes micro-organismos em um solo de Reserva Particular do Patrimônio Natural, verificou que houve tendência de superioridade da população de fungos sobre a de bactérias. Esta condição encontrada por Souto (2002), foi atribuída aos valores de pH do solo avaliado por ele, os quais foram ácidos, oscilando entre 5,5 e 5,7, em todos os períodos de amostragem, favorecendo o desenvolvimento dos fungos, podendo-se supor que o pH dos solos avaliados nas área de mata nativa, campo em *pousio* e cultivo de hortaliças encontram-se em faixas mais neutras, tais como 6 a 8, influenciando positivamente a população de bactérias.

A área de campo em *pousio* avaliada neste trabalho apresenta como principal cobertura vegetal as Poaceas. Estas plantas apresentam um efeito rizosférico intenso em virtude do seu abundante sistema radicular, o que geralmente promove elevada taxa de reciclagem (BRASIL; BALDANI; BALDANI, 2005) causando fortes efeitos na comunidade de bactérias, refletindo nos valores obtidos para esta área, um pouco maiores dos obtidos para a área de mata nativa.

Melloni et al. (2001), avaliando a comunidade microbiana da região de Minas Gerais, também não encontram diferenças significativas entre as áreas de mata ciliar e de campo cerrado para o número de micro-organismos celulolíticos.

A área de cultivo apresentou a maior densidade observada nas três áreas avaliadas em relação as bactérias aeróbias (tab. 2).

De acordo com Miranda, Ferreira e Menezes (1997), a ocorrência de matéria orgânica e de material mineral pouco alterado nas camadas superficiais favorece a maior aeração e disponibilidade de nutrientes, além de manter a umidade e temperatura constantes, com consequente aumento na população de bactérias, refletindo nos valores observados para a área de cultivo, visto que o solo permanece constantemente coberto de acordo com o manejo ecológico, e no período de coleta o solo desta área apresentava a cobertura vegetal de inverno.

Segundo Souto et al. (2008) de todos os micro-habitats do solo, a serapilheira e a rizosfera são os lugares mais ricos em recursos, sendo estes preferidos pelos organismos edáficos para desenvolver seu ciclo de vida.

Contudo no que diz respeito a contagem de fungos e bactérias produtoras de celulase a área de cultivo apresentou as menores densidades (tab. 2).

Os teores de umidade no solo observados na primeira coleta correspondem a 11% para a área de mata, 10% para a área de campo e 15% para a área de cultivo de hortaliças. Esta condição surgiu devido a elevada precipitação que ocorreu na semana que antecedeu a coleta. Os valores baixos de populações de fungos encontrados na área de cultivo podem ser reflexo desta umidade no solo, pois diminui a disponibilidade de oxigênio. Souto (2002), estudando a população de fungos e bactérias em solo degradado no semi-árido do Estado da Paraíba após a aplicação de diferentes adubos orgânicos, encontrou maior população de fungos no período de menor índice pluviométrico. Para Miranda, Ferreira e Menezes (1997), a umidade é, indiretamente, muito importante, especialmente em solos de textura fina, porque, quanto maior a umidade, menor a disponibilidade de O_2 para crescimento microbiano.

Além disto, de acordo com Brasil, Baldani e Baldani (2005), a composição de plantas de determinada área pode influenciar a diversidade da comunidade microbiana graças à variabilidade da composição química de seus exsudados. Sendo os micro-organismos celulolíticos fortemente influenciados pela composição vegetal do ambiente, acredita-se que o material celulósico presente na área de cultivo pode não ter sido suficiente para estimular a comunidade de bactérias produtoras de celulase.

4.2 Segunda coleta

Na segunda coleta a área de mata nativa apresentou flutuações nas densidades das populações avaliadas, representando que o equilíbrio microbiológico não foi eficiente. A área de campo, no entanto, não apresentou tais variações, portanto os fatores que influenciaram a comunidade microbiológica ocorreram com mais intensidade no solo da área de mata nativa (tab. 3).

Tabela 3. Número de micro-organismos (log_{10}) relacionados às três áreas amostrais obtidos na segunda coleta. Média de cinco repetições.

Área	Bactérias aeróbias ($UFC.g^{-1}$)	Fungos (UFC.g-1)	Produtores de celulase (UFC.g-1)	Solubilizadores de fosfato (UFC.g-1)
Mata	5,46b*	3,68c	3,36ab	6,67a
Campo	5,48b	4,02b	3,19b	5,28c
Cultivo	5,97a	4,66a	3,58a	5,59b
CV (%) = 3,84				

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

Coêlho et al. (2008) ao analisar o número de micro-organismos celulolíticos em dois ecossistemas (plantio de cana-de-açúcar e reflorestamento) em comparação a mata natural, observaram que o número de unidades formadoras de colônias foi igual nos três ecossistemas. Diferente do obtido neste trabalho, em que houve diferença nos valores observados entre as áreas analisadas.

As diferenças nos valores obtidos em relação a área de mata e campo, na segunda coleta, cujo período foi mais seco e com temperaturas mais amenas, nos fazem supor que algum destes fatores influenciaram a microbiota celulósica (FACCI, 2008) além da presença de material orgânico.

A manutenção de cobertura vegetal no solo é propício aos fungos, decompositores primários de resíduos vegetais na superfície do solo (CARNEIRO et al., 2004), contudo a área de mata nativa, onde esta condição é permanente através da serrapilheira, não foi observada este estímulo, evidenciando que há multiplicidade de fatores que agem na comunidade microbiológica.

No que diz respeito à população de fungos a área de campo obteve valores maiores em relação à área de mata, visto a maior quantidade de raízes encontradas na área de campo. Resultados semelhantes foram obtidos por Pereira, Neves e Drozdowicz (1999) que mostraram que na rizosfera, de modo geral, os números de $UFC.g^{-1}$ de solo seco das populações fúngicas foram superiores aos números do

solo não-rizosférico, evidenciando o estímulo diferenciado nas diversas populações da comunidade microbiana.

A flutuação nas contagens vista na área de mata nativa em relação às outras áreas avaliadas não ocorreu para a contagem total de bactérias aeróbias (tab. 2), podendo-se supor que esta contagem não é suficientemente sensível para utilizá-la na avaliação da qualidade microbiológica do solo.

Entretanto a ausência de diferença estatística entre as áreas de mata nativa e campo em *pousio* podem ter surgido decorrente do equilíbrio microbiológico, que surge ao analisarmos a comunidade como um todo, mas não exerce influencia quando grupos selecionados são estimulados como no caso do crescimento em meios de cultura ricos em nutrientes específicos.

Com exceção da comunidade de bactérias solubilizadoras de fosfato a área de cultivo de hortaliças apresentou os maiores valores em relação às outras duas áreas avaliadas (tab. 2), evidenciando que as práticas de manejo utilizadas estimulam a comunidade microbiológica do solo, minimizando os impactos em sua dinâmica.

A superioridade numérica das populações bacterianas nestes agroecossistemas, em relação ao ecossistema natural, confirma resultados obtidos em regiões subtropicais do Rio Grande do Sul, em cujos campos nativos as populações bacterianas foram numericamente inferiores às dos sistemas cultivados (NUERNBERG; VIDOR; STAMMEL, 1984; CATTELAN; VIDOR, 1990), sendo relacionado, de modo geral, ao aporte de material orgânico prontamente mineralizável e as condições físicas e químicas controladas.

Nos canteiros de cultivo de hortaliças, manejados sob o sistema de produção ecológica, busca-se manter o solo permanentemente coberto, além disto, o seu revolvimento profundo é evitado dando suporte para a manutenção dos micro-habitas, local onde os micro-organismos se desenvolvem, influenciando positivamente suas populações (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Castro e Prado (1993), avaliando a atividade de micro-organismos do solo em sistemas de manejo, verificaram maiores números de micro-organismos celulolíticos em períodos mais secos, mas somente quando considerado o sistema de plantio direto, resultado semelhante ao obtido no presente trabalho em relação a área de cultivo de hortaliças, que comparando a primeira coleta (3,17) com a segunda (3,58), obteve um aumento na população.

Contudo, os valores obtidos para a área de cultivo de hortaliças, podem ser reflexo do surgimento de alguma mancha de fertilidade, ou seja, locais com maior concentração de resíduos orgânicos, que aparecem devido a aplicação de adubação orgânica de forma não homogênea, surgindo picos de populações microbianas, sendo normal essa heterogeneidade quando o trabalho é realizado no campo (LOSEKANN, 2009).

Houve uma variação evidente entre as coletas na contagem total de fungos para a área de cultivo, sendo maior na segunda coleta (4,66) em relação à primeira (3,55).

Esta variação pode ter ocorrido, pois o solo dos canteiros de cultivo estava sendo preparado para o plantio, portanto matéria orgânica foi acrescentada. No processo de decomposição da matéria orgânica existe certa sucessão dos micro-organismos envolvidos, sendo os fungos responsáveis pela primeira fase, degradando a matéria orgânica em partículas menores e possibilitando a atuação das bactérias, que são responsáveis pela mineralização. Com o aumento da população de bactérias a população de fungos decai, por diversos fatores, dentre os quais se destacam o pH, que tende a se tornar mais básico, a competição com as bactérias e a disponibilidade de nutrientes (LOREAU, 2001). Contudo deve-se levar em consideração que, de uma maneira geral, a população de bactérias é sempre maior que a de fungos no solo (LOREAU, 2001).

Dentre as densidades populacionais obtidas as bactérias solubilizadoras de fosfato foi o grupo que mais se diferenciaram em relação aos outros grupos analisados. Neste grupo funcional a área de mata apresentou a maior densidade populacional (6,67), seguida da área de cultivo (5,59) e, com o menor valor (5,28) a área de campo, (tab. 3).

Em todas as áreas analisadas a população de solubilizadores de fosfato foi maior em relação a população de bactérias produtoras de celulase.

De um modo geral, os solos no Brasil possuem baixas concentrações de fósforo, esta limitação pode reduzir a ocorrência de populações de bactérias solubilizadoras de fosfato, pois estas não têm substrato suficiente para manterem-se (GOSH et al.,2012).

Falleiro et al. (2003) observaram incremento de fósforo em campos sob plantio direto, segundo estes autores, isto se deu em função da manutenção de resíduos de plantas na superfície do solo, o que favorece a ciclagem de fósforo,

contribuindo para o crescimento de bactérias solubilizadoras de fosfato. Esta cobertura pode ser comparada a serrapilheira presente na área de mata, justificando os valores observados para este solo.

A oferta de maior quantidade e, principalmente, de diversidade de substratos potencialmente mineralizáveis nos canteiros de cultivo de base ecológica e no solo de mata nativa deve ter favorecido os micro-organismos solubilizadores de fosfato (BANDICK; DICK, 1999).

O solo sob cultivo orgânico de hortaliças obteve valores altos de bactérias solubilizadoras de fosfato, maiores que na área de campo, mas menores que na área de mata nativa. Barroti e Nahas (2000) mostraram que o número de micro-organismos foi dependente da adubação, obtendo-se maior população em solo de cultivo acrescido de adubos orgânicos, em relação ao controle (não adubado). Realçando a influencia dos índices de matéria orgânica e nutrientes no solo sob a comunidade microbiana em geral.

O campo apresentou os menores valores referentes a população de bactérias solubilizadoras de fosfato. Esta diferença também foi relatada por Buzinaro, Barbosa e Nahas (2008), que ao avaliar um campo com produção de gramíneas, constataram menor presença de bactérias solubilizadoras de fosfato em relação ao cultivo de outros grupos de plantas. A presença de gramíneas proporciona maiores quantidades de substratos de fácil e rápida decomposição, proveniente da liberação de exsudatos das raízes, assim modificando a composição da comunidade microbiana (BERTINI, 2010).

Entre os fatores responsáveis por condições mais favoráveis ao desenvolvimento microbiano, nas áreas sob vegetação natural, merecem destaque a ausência de preparo do solo, resultando em maior presença de raízes, as quais aumentam a entrada de substratos orgânicos no sistema, via exudatos radiculares, a maior diversidade florística, quantidade e qualidade dos resíduos vegetais retornados ao solo proporcionando a ocorrência de menor variação e de níveis mais adequados de temperatura e umidade (Oliveira et al., 1999). O somatório desses fatores contribuiu para a ocorrência dos valores obtidos para as populações de micro-organismos celulolíticos e solubilizadores de fosfato neste trabalho.

Além disto, Cattelan e Vidor (1990), em experimento de campo no Rio Grande do Sul, observaram que as variações climáticas exerceram forte efeito sobre a flutuação da microbiota do solo, verificando-se uma tendência de estímulo em

épocas de boa disponibilidade hídrica e temperaturas amenas, características observadas na segunda coleta.

4.3 Bactérias diazotróficas

A fisiologia e a população dos micro-organismos diazotróficos é marcada pelas propriedades inerentes da enzima que rege seu metabolismo, a nitrogenase. São elas: alta sensibilidade ao oxigênio; necessidade dos metais ferro, molibidênio ou vanádio, seus componentes estruturais; suprimento adequado de poder redutor; Mg e ATP para a sua atividade; ambiente onde o nitrogênio combinado não esteja disponível (REIS; TEIXEIRA, 2012).

As bactérias diazotróficas estabelecem com as plantas relações simbióticas, e tem como local de desenvolvimento preferencial a região rizosférica, visto que apresentam como forma de desenvolvimento a formação de nódulos nas raízes de seus hospedeiros (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995).

As análises realizadas neste trabalho foram efetuadas em solo não rizosférico refletindo na ausência de diferenças estatísticas entre as áreas amostrais. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 4, referente a primeira coleta, e na tabela 5, referente a segunda coleta.

Tabela 4. Número de bactérias diazotróficas (log_{10}) relacionadas aos meios NFb, JNFb, JMV, LGI e LGI-P, presente nas três áreas amostrais, obtidos na primeira coleta. Média de três repetições.

Áreas	NFb ($UFC.g^{-1}$)	JNFb ($UFC.g^{-1}$)	JMV ($UFC.g^{-1}$)	LGI ($UFC.g^{-1}$)	LGI-P ($UFC.g^{-1}$)
1ª coleta					
Mata nativa	3,51a*	6,80a	0,86b	4,12a	5,85a
Campo em *pousio*	3,35a	4,78a	3,86a	3,84a	5,79a
Cultivo de hortaliças	5,18a	6,10a	0,86b	6,33a	6,51a
CV (%) = 28,89					

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

Tabela 5. Número de bactérias diazotróficas (log10) relacionadas aos meios NFb, JNFb, JMV, LGI e LGI-P, presente nas três áreas amostrais, obtidos na segunda coleta. Média de três repetições.

Áreas	NFb ($UFC.g^{-1}$)	JNFb ($UFC.g^{-1}$)	JMV ($UFC.g^{-1}$)	LGI ($UFC.g^{-1}$)	LGI-P ($UFC.g^{-1}$)
Mata nativa	5,33a*	5,17a	1,73a	5,64a	4,68a
Campo em *pousio*	5,18a	3,41a	0a	5,12a	4,98a
Cultivo de hortaliças	5,74a	4,64a	0,86a	5,32a	5,09a
CV (%) = 28,46					

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$; teste Tukey).

Bandick e Dick (1999) verificaram que a população de micro-organismos diazotróficos apresentou flutuações significativas entre os tratamentos, fato que não foi verificado nestes resultados (tab. 9). A fixação biológica de nitrogênio é um processo regulado pela necessidade do ambiente e das espécies fixadoras, pois, a enzima nitrogenase, responsável pela redução do N2 é inativada, quando submetida a presença de amônio (Rudnik et al., 1997). Em áreas não perturbadas, esse processo biológico é pouco estimulado, pois a ciclagem eficiente garante a manutenção do metabolismo e da taxa de crescimento, motivo pelo qual nenhuma área diferiu entre si na segunda coleta.

Além disto, a presença do hospedeiro é tão relevante quanto os atributos físicos e químicos do solo para a densidade de bactérias fixadoras de nitrogênio (MELLONI et al.,2004), portanto hospedeiros preferenciais dos gêneros avaliados podem ser de crescimento restrito nas áreas amostrais refletindo nos resultados obtidos.

Apesar de não apresentarem diferenças estatísticas, foi possível verificar diferenças nos valores absolutos entre os meios de cultura utilizados, representando as diversas estratégias de desenvolvimento que os gêneros de bactérias fixadoras de nitrogênio estudadas possuem.

As bactérias do gênero *Azospirillum*, avaliada através dos meios de cultura NFb (*A. brasiliense*) e LGI (*A. amazonense*) no presente trabalho, são bactérias diazotróficas associativas endofíticas, mas que podem sobreviver no solo na forma de cistos (MOREIRA, et al., 2010), refletindo nas densidades obtidas para estes meios. Bactérias do gênero *Azospirillum*, além de formarem cistos, possuem diversos

mecanismos de sobrevivência em solo não rizosférico, dentre eles estão produção de melanina, poli-β-hidroxibutirato (PHB) e polissacarídeos, e mudança na forma da célula (MOREIRA et al., 2010).

Brasil, Baldani e Baldani (2005), obtiveram a maior percentagem de bactérias caracterizadas morfologicamente como *A. amazonense,* resultado semelhante ao obtido nesta pesquisa, onde o meio LGI, que seleciona tal espécie, apresentou contagens altas em ambas as coletas. Reis-Junior (2000) também obteve número maior de *A. amazonense*. Segundo o autor, a adaptabilidade desta espécie a pH ácido também é responsável pelos altos números de *A. amazonense*, uma vez que o pH ácido é uma característica comum à maioria dos solos brasileiros. Além disto, segundo este mesmo autor, *A. amazonense,* apresenta grande diversidade genética, o que reflete em elevada capacidade de sobrevivência e colonização desta espécie no ambiente.

Segundo Moreira et al. (2010), o gênero *Herbaspirillum* tem sua ocorrência um pouco mais restrita do que as demais espécies de diazotróficos atualmente conhecidas, apresentando baixa sobrevivência em solo não rizosférico. Portanto, os representantes do gênero *Herbaspirillum* são considerados bactérias endofíticas obrigatórias (BALDANI et al., 1997), esta observação indica o contrário do observado no presente trabalho, já que o meio JNFb, apresentou uma das maiores densidades em relação aos outros meios de cultura observados.

Esta espécie tem sido isolada de vários membros da família Poaceae sendo encontrada colonizando raízes, caule e parte aérea, de plantas como *Pennisetum purpureum (*capim-elefante*),* que é utilizado como quebra-vento ao redor dos canteiros de cultivo de hortaliças, além de ser incorporado ao solo como matéria orgânica, o que pode ter influenciado na contagem destes micro-organismos (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995). Além disto, o grupo Poaceae é a cobertura vegetal predominante da área de campo em *pousio*.

Atualmente, o gênero *Burkholderia* tem 62 espécies descritas com grande diversidade funcional (MOREIRA et al., 2010), o que pode ter um importante papel na habilidade desta bactéria de se adaptar a diferentes ambientes, podendo ser de vida livre ou em associações com vegetais. Contudo o presente estudo obteve número relativamente baixos em relação a densidade populacional destas bactérias nas duas coletas, avaliada através do meio de cultura JMV, resultados semelhantes também foram observados por Baldani, Baldani e Döbereiner (2000), que sugeriram

que estas bactérias podem estar num estado viável, mas não cultivável no solo, portanto não refletindo em perda de função no solo.

Este gênero tem relevância ambiental, pois além de participar do ciclo do nitrogênio, também tem sido estudado quanto a sua capacidade de degradação de poluentes, devido a sua grande diversidade de utilização de fontes de carbono (MOREIRA et al., 2010).

Estas flutuações nas populações podem não refletir na perda de função, visto que os processos de mineralização do C e N orgânicos apresentam alto grau de redundância, isto é, diferentes populações de micro-organismos podem, em diferentes condições ambientais, realizar esses processos (CURY, 2002).

Para Vargas e Scholles (2000) os micro-organismos são muito sensíveis e podem ser influenciados pelos fatores bióticos e abióticos. Segundo estes autores, dentre as variáveis climáticas, a precipitação pluvial e a temperatura são as que exercem maior influência.

Diante dos resultados obtidos, é possível inferir que diversos fatores afetam os organismos do solo, tornando suas populações extremamente variáveis, sendo dependentes do tipo de solo, da vegetação e das condições climáticas, podendo ser encontradas grandes variações entre ecossistemas distintos.

Facci (2008) ao avaliar indicadores químicos, físicos e biológicos, observou que os fatores climáticos promoveram mudanças mais acentuadas na microbiota do solo, enquanto que as alterações causadas pelo uso do mesmo sejam apontadas pelos micro-organismos em prazos mais longos. Supõe-se que este fato também ocorreu na presente análise, pois houve mudanças significativas na contagem de micro-organismos em geral de uma coleta para outra, onde houve também grandes flutuações na temperatura e umidade. Portanto acredita-se que seria necessária a realização de análises ao longo do tempo para indicar a qualidade microbiológica dos solos avaliados.

Apesar destas flutuações, Facci (2008) verificou que com os resultados obtidos em seu trabalho, a comparação de médias apontou a variável número de micro-organismos celulolíticos, carbono da biomassa microbiana e as enzimas protease e celulase como boas indicadoras para avaliar a qualidade do solo. Em casos de alterações ambientais de grande magnitude a microbiota passa por uma fase de adaptação que pode durar semanas ou anos (COÊLHO et al.,2008), portanto a transformação de ambientes naturais em áreas de cultivo, ainda que de

pequenas extensões, geram grandes impactos na população microbiológica, podendo ser estimulada ou inibida dependendo das práticas utilizadas.

A diversidade microbiana está inclusa em muitos programas de monitoramento da qualidade do solo em países europeus (FACCI, 2008). Apesar do importante papel dos micro-organismos e seus processos na recuperação de áreas degradadas, são poucos os estudos que relacionam a qualidade do solo com atributos microbiológicos, especificamente com a população e diversidade microbiana (MELLONI et al., 2001) no Brasil.

A respeito das análises de diversidade funcional, esta reside no fato de que, somente com base nas alterações na diversidade genética, não é possível inferir se algumas funções do solo foram perdidas ou não (TÓTOLA; CHAER, 2002). Quanto maior a redundância funcional e a diversidade, mais rápido o ecossistema pode retornar às condições originais iniciais, ou seja, maior a sua resiliência.

5 Conclusões

1. A população cultivável de bactérias aeróbias não apresentou diferença estatística entre a área de mata nativa e campo em pousio.

2. A área de cultivo de hortaliças apresentou a maior densidade de bactérias aeróbias em relação às outras áreas avaliadas nas duas coletas realizadas, demonstrando que as práticas de manejo ecológico estimulam este grupo de micro-organismos.

3. Quanto aos fungos, na primeira coleta a área de cultivo apresentou o menor valor em relação às outras duas áreas avaliadas, que não diferiram entre si. Na segunda coleta, a área de cultivo apresentou a maior contagem em relação às outras áreas, além disto a área de mata apresentou o menor valor diferindo significativamente da área de campo, demonstrando que os fungos foram sensíveis a alterações no ambiente.

4. Para inferir com segurança a qualidade microbiológica do solo a partir das populações de micro-organismos, são necessárias mais análises, visto a influência de fatores ambientais sobre as populações de micro-organismos, que não foram estudados no presente experimento.

5. Quanto à população de bactérias produtoras de celulase, foram verificadas diferenças entre os valores obtidos nas duas coletas nas diferentes áreas, indicando que este grupo é sensível a alterações em seu habitat.

6 Em relação aos resultados obtidos para a densidade de bactérias produtoras de celulase, a área de cultivo diferiu estatisticamente da área de mata, que apresentou os maiores valores observados, e da área de campo em pousio, que apresentou a menor densidade. Demonstrando que este grupo de micro-organismos é sensível às características ecológicas de cada ambiente.

7 Dentre os grupos funcionais avaliados, bactérias produtoras de celulase, bactérias solubilizadoras de fosfato e bactérias fixadoras de nitrogênio, as bactérias

solubilizadoras de fosfato observadas na segunda coleta, apresentaram as maiores densidades, indicando o potencial ecológico dos solos analisados em relação ao ciclo do fósforo.

8 A população de bactérias diazotróficas não apresentou diferenças significativas entre as áreas, em ambas as coletas, o que pressupõem que suportam pressões de degradação ambiental maiores, e talvez não sejam indicador sensíveis o suficiente para uso como indicadores de qualidade microbiológica do solo.

Referências

ALTIERI, Miguel A. **Agroecologia: a dinâmica produtiva da agricultura sustentável.** 5.ed. Porto Alegre: UFRGS, 2004. 110p.

ARAÚJO, Edson Alves de. **Qualidade do solo em ecossistemas de mata nativa e pastagens na região leste do Acre, Amazônia Ocidental.** 2008. 253f. Tese (Doutourado em Solos e Nutrição de Plantas)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

ARAÚJO, R. S.; HUNGRIA, M. **Microrganismos de importância agrícola**. 1.ed. Brasília: EMBRAPA – SPI, 1994. 236p.

BAGER, A.; FERRER, R.; VILAGRAN, L. R.; WINCK, G. R.; MARAGNO, F. P. Caracterização da área do Parque Municipal Farroupilha, Pelotas, RS, visando a sua implantação como uma unidade de conservação. In: SIMPÓSIO DE ÁREAS PROTEGIDAS, 3., 2005, Pelotas. **Anais do III Simpósio de Áreas Protegidas.** Pelotas, 2005. p.162-169.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, n. 5/6, p. 911-922, 1997.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia spp*. **Biology and Fertility of Soils**, v.30, n.5, p.485 – 491, 2000.

BANDICK, A. K.; DICK, R. P. Field management effects on soil enzymes activities. **Soil Biology & Biochemistry,** v. 31, n. 7, p. 1471-1479, 1999.

BARROTI, G.; NAHAS, E. População microbiana total e solubilizadora de fosfato em solo submetido a diferentes sistemas de cultivo. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.35, n.10, p.2043-2050, 2000.

BERTINI, Simone Cristina Braga. **Indicadores microbiológicos de qualidade do solo em florestas de araucária no estado de São Paulo**. 2010. 109f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, São Paulo.

BORGES, C. D.; MERCANTE, F. M., SALTON, J. C; CARVALHO, E. M. Biomassa microbiana do solo em fitofisionomias no sul de Mato Grosso do Sul. **Ensaios e ciência – Ciências biológicas, agrárias e da saúde,** v.8, n.1, p.51-62, 2009.

BRASIL, M. S; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras do pantanal sul matogrossense. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, n.1, p.179-190, 2005.

BUSCHER, C. A., REIS, V. M. Biofertilizante **contendo bactérias diazotróficas**. 1.ed. Seropédica: EMBRAPA Agrobiologia, 2008. 17p.

BUZINARO, T. N.; BARBOSA, J. C.; NAHAS, E. Atividade microbiana do solo em pomar de laranja em resposta ao cultivo de adubos verdes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 2, p. 408-415, 2009.

CANHOS, V. P.; MANFIO, G. P. Recursos Microbiológicos para Biotecnologia. Disponível em: < http://www.anbio.org.br/pdf/2/mct_recursos_biologicos.pdf>. Acesso em: 17 nov. 2012.

CARDOSO, E. J. B. N. Ecologia microbiana do solo. In: **Microbiologia do Solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p.33-39.

CARDOSO, J. H; SCHWONKE, A. B; NACHTIGAL, J. C. A prática florestal de estacas vivas com Aroeira Vermelha (*Schinus terebinthifolius* RADDI): resultados preliminares sobre os efeitos dos tratamentos diâmetro e incisão na casca. Disponível em: <http://www.sct.embrapa.br/cdagro/tema02/02tema10.pdf >. Acesso em: 08 nov. 2011.

CARNEIRO, R. G.; MENDES, I. C.; LOVATO, P. E.; CARVALHO, A.M.; VIVALDI, L. J. Indicadores biológicos associados ao ciclo do fósforo em solos de Cerrado sob plantio direto e plantio convencional. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.39, n.7, p.661-669, 2004.

CASTILHOS, D. D.; VIDOR, C.; CASTILHOS, R. M. V. Atividade microbiana em solo suprido com lodo de curtume e cromo hexavalente. **Revista Brasileira de Agrociência,** v.6, n.1, p.71-76, 2000.

CASTRO, O. M.; PRADO, H. Avaliação da atividade de microrganismos do solo em diferentes sistemas de manejo de soja. ***Sciencia* Agrícola**, v.50, n.2, p.212-219, 1993.

CATTELAN, A. J.; VIDOR, C. Sistemas de culturas e a população microbiana do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.14, n.2, p.125-132, 1990.

COCKING, Edward C. Trends in rice researchs: Novel use of biotechnology. **Cathiers Options Méditerranéennes**, v.24, n.2, p.71-74, 2003.

COÊLHO, D. G.; SANTOS, T. M. C.; ALBUQUERQUE, L. S.; CAMPOS, V. B., PRAZERES, S. S. Quantificação de fungos celulolíticos em solos de três ecossistemas. **Revista Verde**, v.1, n.3, p.45-49, 2008**.**

CURY, Juliano de Carvalho. **Atividade microbiana e diversidades metabólica e genética em solo de mangue contaminado com petróleo**. 2002. 95f. Tese (Mestrado em Agronomia)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

CURY, R. M.; NOGUEIRA, M. A. Atividade enzimática em solo sob transição de sistema de produção agrícola convencional para agroecológico. In: Encontro Anual de Iniciação Científica, 16., 2007, Maringá. **Anais do XVI Encontro Anual de Iniciação Científica**. Maringá: UEM, 2007. p.12-13.

D’ANDRÉA, A. F.; SILVA, M. L. N.; CURI, N.; SIQUEIRA, J. O.; CARNEIRO, M. A. C. Atributos biológicos indicadores da qualidade do solo em sistemas de manejo na região do cerrado no sul do estado de Goiás. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.26, n.5, p.913-923, 2002.

DICK, W. A.; TABATABAI, M. A. Significance and potential uses of soil enzymes. In: Soil microbial ecology: applications in agricultural and environmental management. Ohio: Marcel Dekker, 1992. p.95-127.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. 2.ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CNPAB, 1995. 60 p.

DORAN, J. W.; PARKIN, T. B Defining and assessing soil quality. In: DEFINING soil quality for a sustainable environment. Madison: Soil Science Society of America Special Publication Number 35, 1994. p.1-20.

DUARTE, E. M. G.; FÁVERO, C. Terra forte. **Revista Agriculturas: experiências em agroecologia**, v.5, n.3, p.11–15, 2008.

FACCI, Luisa Ditzel. **Variáveis microbiológicas como indicadoras da qualidade do solo sob diferentes usos.** 2008. 104f. Tese (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical)-Instituto Agronômico, Universidade de Campinas, Campinas.

FALLEIRO, R. M. et al. Influência dos sistemas de preparo nas propriedades químicas e físicas do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.27, n.6, p.1097-1104, 2003.

FERNÁNDEZ, L. A.; ZALBA, P.; GÓMEZ, M. A.; SAGARDOY, M. A. Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. **Ciencia del Suelo**, v.23, n.1, p.31-37, 2005.

FERREIRA, Daniel Furtado. **Sistemas de análises estatísticas para dados balanceados**. 1.ed. Lavras: UFLA/ DEX/ SISVAR, 2000. 145p

FERREIRA, T. N.; SCHWARZ, R. A.; STRECK, E. V. **Solos:** manejo integrado e ecológico - elementos básicos. 1.ed. Porto Alegre: EMATER/RS, 2000. 95p.

FIALHO, J. S.; GOMES, V. F. F.; OLIVEIRA, T. S.; JÚNIOR, J. M. T. S. Indicadores da qualidade do solo em áreas sob vegetação natural e cultivo de bananeiras na Chapada do Apodi- CE. **Revista Ciência Agronômica**, v.37, n.3, p.250-257, 2006.

GHOSH, U.; SUBHASHINI, P.; DILIPAN, E.; RAJA, S.; THANGARADJOU, T.; KANNAN, L. **Journal of Ocean University China**, v. 11, n.1, p.86-92, 2012.

GLIESSMAN, Stephen R. **Agroecologia:** processos ecológicos em agricultura sustentável. 2.ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 2000. 653p.

GUNAPALA, N.; SCOW, K. M. Dynamics of soil microbial biomass and activity in conventional and organic farming systems. **Soil Biology and Biochemistry**, v.30, n.6, p.805-816, 1998.

HAYNES, R. J. Size and activity of the soil microbial biomass under grass and arable management. **Biology and Fertility of Soils**, v.30, n.2, p.210-216, 1999.

KLAMT, E.; REINERT, D. J.; Ciência do solo: Evolução do conhecimento. In: ELEMENTOS da ciência do solo. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2003. p. 01-12.

LANGE, A.; MOREIRA, F.M.A. Detecção de *Azospirillum amazonense* em raízes e rizosfera de Orchidaceae e de outras famílias vegetais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo***,* v.26, n.3, p.535-543, 2002.

LIMA, H. V.; OLIVEIRA, T. S; OLIVEIRA, M. M.; LIMA, P. J. B. F. Indicadores de qualidade do solo em sistemas de cultivo orgânico e convencional no semi-árido cearense. **Revista Brasileira de Ciência do Solo,** v.31, n.5, p.1085-1098, 2007.

LISBOA, Bruno Brito. **Parâmetros microbiológicos como indicadores de qualidade do solo em sistemas de manejo**. 2009. 84f. Tese (Mestre em Ciência do Solo)-Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

LOREAU, Michel. Microbial diversity, producer-decomposer interactions and ecosystem processes: a theoretical model. **Proceedings: The Royal Society of London,** v.268, n.97, p.303-309, 2001.

LOSEKANN, Marno Elisandro. **Caracterização, classificação e indicadores de qualidade do solo em localidades de agricultura familiar do estado do Rio Grande do Sul.** 2009. 88f. Tese (Mestrado em Ciência do solo) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

LOURENTE, E. R. P.; MERCANTE, F. M.; TOKURA, A. M.; MIOTTO, D. Atributos químicos e microbiológicos avaliados em sistemas de cultivo agrícolas e florestais. **Revista Brasileira de Agroecologia,** v.3, n.2, p.10-13, 2008.

MACHADO, Altair Toledo. **Perspectiva do melhoramento genético em milho (*Zea mays* L.) visando eficiência na utilização do nitrogênio.** 1997. 219f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)-Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MARCHIORI-JÚNIOR, J.M.; MELO, W.J. Carbono, carbono da biomassa microbiana e atividade enzimática em um solo sob mata natural, pastagem e cultura do algodoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.23, n.2, p.257-263, 1999.

MATSUOKA, M.; MENDES, I. C.; LOUREIRO, M. F. Biomassa microbiana e atividade enzimática em solos sob vegetação nativa e sistemas agrícolas anuais e perenes na região de Primavera do Leste (MT). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.27, n.3, p.425-433, 2003.

MELLONI, R.; NÓBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Densidade e diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do solo**, v.28, n.1, p.85-93, 2004.

MELLONI, R.; PEREIRA, L. G.; TRANNIN, I. C. B.; SANTOS, D. R. D.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Características biológicas de solos sob mata ciliar e campo cerrado no sul de Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v.25, n.1, p.7-13, 2001.

MENDES, I. C.; SOUZA, L. V.; RESCK, D. V. S.; GOMES, A. C. Propriedades biológicas em agregados de um latossolo vermelho-escuro sob plantio convencional e direto no Cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do solo,** v.27, n.3, p.435-443, 2003.

MIRANDA, C. S. S.; FERREIRA, M. G. V. X.; MENEZES, M. Atividade biológica de solos com A Chernozêmico na Zona da Mata Norte de Pernambuco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIAS DO SOLO, 26., 1997, Rio de Janeiro. **Anais do XXVI Congresso Brasileiro de Ciências do Solo.** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1997. p.1-4.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo.** 2.ed. Lavras: UFLA, 2006. 626p.

MOREIRA, F. M.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. ***Comunicata Scientiae***, v.1, n.2, p.74-99, 2010.

MORGANTE, Patrícia G. Fixação biológica e assimilação de nitrogênio. Disponível em: < http://pt.scribd.com/doc/3319817/Fixacao-Biologica-e-Assimilacao-de-Nitrogenio>. Acesso em: 24 ago. 2012.

MORROW, Rosemary. **Permacultura passo a passo.** 1.ed. Porto Alegre: IPEC, 1993. 155p.

NAHAS, E.; CENTURION, J. F.; ASSIS, L. C. Efeito de características químicas dos solos sobre os microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.18, n.2, p.49-53, 1994.

NANNIPIERI, P.; ASCHER, J.; CECCHERINI, M. T.; LANDI, L.; PIETRAMELLARA, G.; RENELLA, G. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, v.54, n.4, p. 655-670, 2003.

NICOLODI, M.; ANGHINONI, I.; SALET, R. T. Alternativa a coleta de uma secção transversal, com pá de corte, na largura da entrelinha, na amostragem do solo em lavouras com adubação em linha no sistema de plantio direto. **Revista Plantio Direto**, v.23, n.2, p.22-28, 2002.

NUERNBERG, N. J.; VIDOR C.; STAMMEL, J. G. Efeitos de sucessões de culturas e tipos de adubação na densidade populacional e atividade microbiana do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo,** v.8, n.2, p.197-203, 1984.

ODUM, E. P. Fundamentos de Ecologia. 6.ed. São Paulo: FCG, 2004. 927p.

OKON, Y.; KAPULNIK, Y. Development and function of *Azospirillum* inoculated roots. **Plant and Soil**, v.90, n.3, p.3-16, 1986.

OLIVEIRA, E. P.; MITJA, D.; BARBOSA, E. M.; MIRANDA, I. P. A.; LUIZAO, F.; LUIZAO, R.; FERRAZ, I.; LEAL FILHO, N.; TOPALL, O.; DESJARDINS, T.; LEEUWEN, J. V. **Impactos ambientais das atividades agro-silvipastoris sobre ecossistemas amazônicos e opções de sustentabilidade**. Brasília: MCT, 1999. 16 p.

OTUTUMI, A. T.; OLIVEIRA, T. S.; MENDONÇA, E. S.; LIMA, P. J. B. F. Qualidade do solo em sistemas de cultivo agroecológicos no município de Tauá – CE. In: Solo e água: aspectos de uso e manejo com ênfase no semi-árido. Viçosa: Editora Viçosa, 2004. p.1–30.

PAULUS, G.; MULLER, A. M.; BARCELLOS, L. A. R. **Agroecologia aplicada**: práticas e métodos para uma agricultura de base ecológica. 1.ed. Porto Alegre: EMATER/RS, 2000. 86p.

PEREIRA, J. C.; NEVES, M. C. P.; DROZDOWICZ, A. Dinâmica das populações bacterianas em solos de Cerrados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.5, p.801-811, 1999.

PEREIRA, J. C.; NEVES, M. C. P.; DROZDOWICZ, A. **Quantificações das populações de bactérias em geral, de bactérias resistentes a antibióticos e de actinomicetos em solos.** 1.ed. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1996. 21p.

PETERSEN, P; ALMEIDA, E. Revendo o conceito de fertilidade: conversão ecológica de manejo dos solo na região do Contestado. **Agriculturas: experiências em agroecologia**, v. 5, n.3, p.16-23, 2008.

POWLSON, D. S.; BROOKES, P. C., CHRISTENSEN, B. T. Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in total soil organic matter due to straw incorporation. **Soil Biology and Biochemistry**, v.19, n.1, p.159-164, 1987.

PRIMAVESI, Ana Maria. Agroecologia e manejo do solo. **Agriculturas: experiências em agroecologia**, v.5, n.3, p.7-10, 2008.

PULLEMAN, M.; HELLIN, J.; VELÁZQUEZ, D. F.; BÁEZ, W. L. Calidad del sueloy rentabilidad de la finca: una situación en la que todos ganan. **Leisa: Revista de Agroecologia**, v. 24, n.2, p.13-16, 2008.

PUPIN, B; FREDDI, O. S.; NAHAS, E. Microbial alterations of the soil influenced by induced compaction. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.33, n.5, p.1207-1213, 2009.

RAIJ, Bernardo Van. **Avaliação da fertilidade do solo**. 2.ed. Piracicaba: Instituto de Potassa & Fosfato, 1981. 142p.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T.; CLACYSSENS, M.; MONTAGU, M. V. Cloning, expression in *Escherichia coli*, and characterization of cellulolytic enzymes of *Azoarcus* sp. A root-invading diazotroph. **Journal of Bacteriology,** v.175, n.21, p.7056–7065, 1993.

REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. S. Fixação Biológica de Nitrogênio – Estado da arte. Disponível em: < http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/biotacap6ID-cgUrYruYKy.pdf>. Acesso em: 10 set. 2012.

REIS-JUNIOR, F. B.; SILVA, L. G.; REIS, V. M; DÖBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açucar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.5, p.-985-994, 2000.

RUDNIK, P.; MELETZUS, D.; GREEN, A.; HE, L.; KENNEDY, C. Regulation of nitrogen fixation by ammonium in diazotrophic species of proteobacteria. **Soil Biology Biochemistry**, v.29, n.4, p.831-841, 1997.

RUEGGER, M. J. S.; TAUK-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados da Estação Ecológica de juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.27, n.2, p.205-211, 2004.

SALA, V. M. R.; FREITAS, S. S.; DONZELI, V. P.; FREITAS, J. G. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, n.3, p.345-352, 2005.

SALLES H. O.; GOMES, G. M. F.; ANDRADE, L. B. S.; EGITO, A. S. **Ensaio alternativo para triagem de extratos proteicos com atividade celulolítica**. 1.ed. Sobral: Embrapa Caprino e Ovinos, 2010. 12p.

SANOMIYA, L. T; NAHAS, E. Microrganismos produtores de hidrolases envolvidos nas transformações dos compostos do carbono e do nitrogênio do solo. **Ciência Rural**, v.33, n.5, p.835-842, 2003.

SCHÄFFER, W. B.; PROCHNOW, M. **A mata atlântica e você: como preservar, recuperar e se beneficiar da mais ameaçada floresta brasileira.** 17.ed. Brasília: APREMAVI, 2002. 156p.

SCHMITZ, José Antônio Kroeff. **Indicadores Biológicos de Qualidade do solo.** 2003. 176f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo)–Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SETTE, Laura Durães. Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE COLEÇÕES CIENTÍFICAS, 1., 2005, Rio de Janeiro. **Anais do I Simpósio Nacional de Coleções Científicas.** Rio de Janeiro: FioCruz, 2005. p.19-20.

SILVA, Luana Mesquita da. Isolamento e caracterização de bactérias diazotróficas em arroz silvestre (*Oryza glumaepatula* Steud) no estado de Roraima. 2010. 60f. Tese (Mestre em Agronomia)-Universidade Federal de Roraima, Boa Vista.

SILVA, Luciana Gomes da. **Uso e monitoramento de indicadores microbiológicos para avaliação da qualidade dos solos de cerrado sob diferentes agroecossistemas.** 2008. 137f. Tese (Mestrado em Agronomia)-Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasilía, Brasília.

SILVA, T. F.; MELLONI, R. Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas não simbióticas em solos da Reserva Biológica Serra dos Toledos, Itajubá (MG). **Revista Brasileira de Ciência do solo**, v.35, n.2, p.359-371, 2011.

SILVEIRA, R. B.; MELLONI, R.; PEREIRA, E. G. Atributos microbiológicos e bioquímicos como indicadores da recuperação de áreas degradadas, no sul de Minas Gerais. **Revista Acadêmica: ciências agrárias e ambientais**, v. 2, n.2, p.21-29, 2004.

SIQUEIRA, J. O; MOREIRA, F. M.; GRISI, B. M.; HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. **Microrganismos e processos biológicos do solo**: perspectiva ambiental. 1.ed. Brasília: EMBRAPA, 1994. 142p.

SOUSA, Adervan Fernandes de. **Indicadores de sustentabilidade em sistemas agroecológicos conduzidos por agricultores familiares do semi-árido cearense.** 2006. 81f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Solos e Nutrição de Plantas)–Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

SOUTO, P. C.; SOUTO, J. S.; MIRANDA, J. R. P.; SANTOS, R. V.; ALVES, A. R. Comunidade microbiana e mesofauna edáficas em solo sob caatinga no semi-árido da Paraíba. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, n.1, p.151-160, 2008.

SOUTO, Patrícia Carneiro. Estudo da dinâmica de decomposição de estercos na recuperação de solos degradados no semi-árido paraibano. 2002. 110f. Tese (Mestrado em Ciência do Solo)-Faculdade de Agronomia, Universidade Federal da Paraíba, Areia.

SOUZA, J. L.; RESENDE, P. Manual de horticultura orgânica. 2.ed. Viçosa: Ed. Aprenda Fácil, 2006. 843p.

TÓTOLA, M. R.; CHAER, G. M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. **Tópicos em ciência do solo**, v.2, n.3, p.195-276, 2002.

VAL-MORAES, S. P.; VALARINI, M. J.; GHINI, R.; LEMOS, E. G. M.; CARRETO-ALVES, L. M. Diversidade de bactérias de solo sob vegetação natural e cultivo de hortaliças. **Revista Ciência Agronômica,** v.40, n.1, p.7-16, 2008

VARGAS, L. K.; SCHOLLES, D. Biomassa microbiana e produção de CO2 e N mineral de um Podzólico Vermelho-Escuro submetido a diferentes sistemas de manejo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, n. 1, p. 35-42, 2000.

VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. **Biologia dos solos dos Cerrados**. 12.ed. Planaltina: Embrapa Cerrados, 1997. 524p.

VINHAL-FREITAS, I. C.; WANGEN, D. R. B.; FERREIRA, A. S.; CORRÊA, G. F.; WENDLING, B. Microbial and enzymatic activity in soil after organic composting. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.34, n.3, p.757-764, 2010.

WEBER, O. B.; CORREIA, D.; SILVEIRA, M. R. S. da; CRISÓSTOMO, L. A.; OLIVEIRA, E. M. de; SÁ, E. G. Efeito de bactéria diazotrófica em mudas micropropagadas de abacaxizeiros Cayenne Champac em diferentes substratos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.6, p.689-696, 2003.

ZILLI, J. É.; RUNJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; COUTINHO, H. L. C.; NEVES, M. C. P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência e Tecnologia,** v.20, n.3, p.391-396, 2003.