

JAIR ALVES DIONÍSIO

IDA CHAPAVAL PIMENTEL

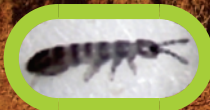
DIANA SIGNOR

ALESSANDRA MONTEIRO DE PAULA

ARLEI MACEDA

ANA LUIZA MATTANA

GUIA PRÁTICO DE BIOLOGIA DO SOLO



**Sociedade Brasileira de
Ciência do Solo**

Núcleo Estadual do Paraná

GUIA PRÁTICO DE BIOLOGIA DO SOLO



**Sociedade Brasileira de
Ciência do Solo**

Núcleo Estadual do Paraná

Diretor
Arnaldo Colozzi Filho
Vice-diretor
Nelson Harger
Tesoureiro
Tiago Santos Telles
Secretário
Luis César Cassol



Reitor
Zaki Akel Sobrinho
Diretor do Setor de Ciências Agrárias
Amadeu Bona Filho
Chefe do Departamento de Solos e Engenharia Agrícola
Nerilde Favaretto

Sociedade Brasileira de Ciência do Solo
Núcleo Estadual Paraná

Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Agrárias
Departamento de Solos e Engenharia Agrícola

GUIA PRÁTICO DE BIOLOGIA DO SOLO

Jair Alves Dionísio
Ida Chapaval Pimentel
Diana Signor
Alessandra Monteiro de Paula
Arlei Maceda
Ana Luiza Mattana



Sociedade Brasileira de
Ciência do Solo

Núcleo Estadual do Paraná

Curitiba - PR

2016



Sociedade Brasileira de Ciência do Solo

Núcleo Estadual do Paraná

Todos os direitos reservados.

É proibida a reprodução parcial ou total desta obra, por qualquer meio, sem autorização expressa, por escrito, da Sociedade Brasileira de Ciência do Solo/Núcleo Estadual Paraná.

Conselho Editorial

Marcelo Ricardo de Lima – Presidente

Alisson Neri

Luciana Grange

Aline Marques Genú

Adonis Moreira

Editor Executivo

Alisson Néri

Revisão e Diagramação

MultCast

Capa

Paulo Marangoni

Sociedade Brasileira de Ciência do Solo / Núcleo Estadual Paraná
Rua dos Funcionários, 1540 - Prédio do Departamento de Solos e Engenharia Agrícola da
Universidade Federal do Paraná - Bairro Cabral - CEP 80035-050 - Curitiba, Paraná
contato@sbc-s-nepar.org.br | <http://www.sbc-s-nepar.org.br>

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

G943 Guia prático de biologia do solo / Autores: Jair Alves
Dionísio...[et al.]. – Curitiba : SB-CS/NEPAR, 2016.
152 p. : il. ; 24 cm.

Inclui bibliografia.
ISBN: 978-85-69146-00-1

1. Biologia do solo – Manuais, guias, etc. 2. Micro-organismos do solo. 3. Solos – Qualidade. I. Dionísio, Jair Alves. II. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Núcleo Estadual Paraná. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Departamento de Solos e Engenharia Agrícola.

CDU 631.46

Impresso no Brasil / *Printed in Brazil*

2016

AUTORES

Jair Alves Dionísio

Engenheiro-agrônomo, Doutor em Biologia do Solo
Universidade Federal do Paraná/Setor de Ciências Agrárias
Departamento de Solos e Engenharia Agrícola
jair@ufpr.br

Ida Chapaval Pimentel

Engenheira-agrônoma, Doutora em Processos Biotecnológicos
Universidade Federal do Paraná/Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Patologia Básica
ida@ufpr.br

Diana Signor

Engenheira-agrônoma, Doutora em Solos e Nutrição de Plantas
Embrapa Semiárido (CPATSA)
diana.signor@embrapa.br

Alessandra Monteiro de Paula

Engenheira-agrônoma, Doutora em Solos e Nutrição de Plantas
Universidade de Brasília
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
ampaula21@gmail.com

Ana Luiza Mattana

Bióloga, Mestre em Entomologia
Universidade Federal do Paraná/Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Genética
almattana@ufpr.br

Arlei Maceda

Engenheiro-agrônomo, Mestre em Entomologia
Agência de Defesa Agropecuária do Paraná
Laboratório Marcos Enrieti
arleimaceda@seab.pr.gov.br

PREFÁCIO

Qualidade do solo é a capacidade do solo cumprir suas funções na natureza. Um bom indicador de qualidade do solo é aquele capaz de elucidar os processos biológicos, físicos e químicos do solo e integrar propriedades ecológicas do sistema solo-planta.

As transformações e as reações que ocorrem no solo são realizadas pelos organismos edáficos, responsáveis pelas mudanças no sistema, e o seu comportamento reflete as alterações ocorridas no solo, sejam induzidas pelo homem ou por eventos naturais.

Por este motivo, os atributos biológicos do solo são os mais sensíveis e apropriados para discriminar sistemas quanto à sua capacidade de cumprir funções. O *Guia Prático de Biologia do Solo* vem ao encontro da demanda atual da ciência do solo em determinar a qualidade do solo de sistemas manejados pelo homem, possibilitando o estudo da capacidade desses sistemas oferecerem serviços ambientais à sociedade.

Este *Guia prático* oferece mais do que a metodologia adequada, oferece o “passo a passo” necessário para que pesquisadores, estudantes e interessados possam lograr êxito nos seus estudos em qualidade do solo.

Profa. Dra. Fabiane Machado Vezzani
UFPR/SCA/DSEA

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

Jair Alves Dionísio e Diana Signor

NOÇÕES DE SEGURANÇA EM LABORATÓRIO 11

CAPÍTULO II

Jair Alves Dionísio e Ida Chapaval Pimentel

AMOSTRAGEM E PREPARO DO SOLO 14

CAPÍTULO III

Ida Chapaval Pimentel, Jair Alves Dionísio e Diana Signor

BACTÉRIAS 17

**PROTOCOLO I – CONTAGEM DE BACTÉRIAS
PELO MÉTODO DE SEMEADURA EM SUPERFÍCIE 20**

CAPÍTULO IV

Ida Chapaval Pimentel, Jair Alves Dionísio e Diana Signor

BACTÉRIAS ESPORULADAS..... 23

**PROTOCOLO II – CONTAGEM DE BACTÉRIAS
ESPORULADAS PELO MÉTODO DE SEMEADURA
EM SUPERFÍCIE (CLARK, 1965) 25**

CAPÍTULO V

Ida Chapaval Pimentel, Jair Alves Dionísio e Diana Signor

FUNGOS 27

PROTOCOLO III – CONTAGEM DE FUNGOS PELO MÉTODO DE SEMEADURA EM SUPERFÍCIE.....	30
---------------------------------------------------------------------------------------	-----------

CAPÍTULO VI

Alessandra Monteiro de Paula

MICORRIZAS ARBUSCULARES	33
-------------------------------	----

PROTOCOLO IV A – EXTRAÇÃO DE ESPOROS DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES DO SOLO PELO MÉTODO DO PENEIRAMENTO ÚMIDO (GERDEMANN; NICOLSON, 1963) E DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE ESPOROS DE FMA EM AMOSTRA DE SOLO	36
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

PROTOCOLO IV B – CLARIFICAÇÃO E COLORAÇÃO DE RAÍZES DE PLANTAS DE ACORDO COM (BRUNDRETT et al., 1996A) PARA AVALIAÇÃO DA TAXA DE COLONIZAÇÃO MICORRÍZICA PELO MÉTODO DE GIOVANNETTI E MOSSE (1980)	39
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

CAPÍTULO VII

Ida Chapaval Pimentel, Jair Alves Dionísio e Diana Signor

ACTINOBACTÉRIAS.....	43
----------------------	----

PROTOCOLO V – CONTAGEM DE ACTINOBACTÉRIAS PELO MÉTODO DE SEMEADURA EM SUPERFÍCIE	46
-----------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

CAPÍTULO VIII

Ida Chapaval Pimentel, Jair Alves Dionísio e Diana Signor

MICRO-ORGANISMOS CELULOLÍTICOS	49
--------------------------------------	----

PROTOCOLO VI – CONTAGEM DE MICRO-ORGANISMOS CELULOLÍTICOS PELO MÉTODO DE SEMEADURA EM SUPERFÍCIE.....	51
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

CAPÍTULO IX

Ida Chapaval Pimentel, Jair Alves Dionísio e Diana Signor

MICRO-ORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATO 54

PROTOCOLO VII – CONTAGEM DE MICRO-ORGANISMOS
SOLUBILIZADORES DE FOSFATO PELO MÉTODO DE
SEMEADURA EM SUPERFÍCIE 57

CAPÍTULO X

Jair Alves Dionísio, Ida Chapaval Pimentel e Diana Signor

ISOLAMENTO DE RIZÓBIOS DE RAÍZES DE LEGUMINOSAS 60

PROTOCOLO VIII – ISOLAMENTO DE RIZÓBIO
DE RAÍZES DE PLANTAS LEGUMINOSAS 63

CAPÍTULO XI

Diana Signor, Jair Alves Dionísio e Ida Chapaval Pimentel

INOCULAÇÃO DE SEMENTES DE LEGUMINOSAS 67

PROTOCOLO IX – INOCULAÇÃO DE SEMENTES
DE LEGUMINOSAS 70

CAPÍTULO XII

Jair Alves Dionísio, Ida Chapaval Pimentel e Diana Signor

RESPIRAÇÃO MICROBIANA 72

PROTOCOLO X – RESPIRAÇÃO BASAL DO SOLO
EM SISTEMA ESTÁTICO, MÉTODO DE ALEF (1995) 75

CAPÍTULO XIII

Jair Alves Dionísio, Ida Chapaval Pimentel e Diana Signor

BIOMASSA MICROBIANA 78

PROTOCOLO XI – MÉTODO DE RESPIRAÇÃO INDUZIDA
(RIS) PELO SUBSTRATO (ANDERSON; DOMSCH, 1978
DESCRITO POR HOPPER, 2006) 81

CAPÍTULO XIV

Diana Signor e Jair Alves Dionísio

DECOMPOSIÇÃO DE RESÍDUOS ORGÂNICOS..... 84

PROTOCOLO XII – DETERMINAÇÃO DA TAXA
DE DECOMPOSIÇÃO DE RESÍDUOS ORGÂNICOS..... 87

CAPÍTULO XV

Jair Alves Dionísio, Ana Luiza Mattana e Diana Signor

PROTOZOÁRIOS 89

PROTOCOLO XIII – MÉTODO CULTURAL PARA
CONTAGEM DE PROTOZOÁRIOS DO SOLO,
ADAPTADO DE SINGH (1946) 92

CAPÍTULO XVI

Arlei Maceda

NEMATOIDES..... 96

PROTOCOLO XIV – MÉTODO DE AVALIAÇÃO DA
DENSIDADE DE NEMATOIDES NO SOLO.....99

CAPÍTULO XVII

Jair Alves Dionísio e Diana Signor

MESOFAUNA 103

PROTOCOLO XV – EXTRAÇÃO DA MESOFAUNA
EDÁFICA PELO MÉTODO DO FUNIL DE BERLESE-
TULLGREN MODIFICADO 107

CAPÍTULO XVIII

Diana Signor e Jair Alves Dionísio

MACROFAUNA 113

PROTOCOLO XVI – MÉTODO DE EXTRAÇÃO DA
MACROFAUNA EDÁFICA (ANDERSON; INGRAM, 1993) 116

CAPÍTULO XIX

Jair Alves Dionísio e Diana Signor

MINHOCAS 119

PROTOCOLO XVII – MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE
MINHOCAS DO SOLO COM EXTRATO DE CEBOLA
(STEFFEN et al., 2010) 123

REFERÊNCIAS 125

ANEXOS 142

ANEXO 1 142

ANEXO 2

TESTE DE GRAM EM SOLUBILIDADE COM KOH (RYU, 1940)144

ANEXO 3

DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE ÁGUA
DO SOLO CONFORME MONTEIRO E FRIGHUETTO (2000)145

ANEXO 4

PADRONIZAÇÃO DE SOLUÇÃO DE HIDRÓXIDO
DE SÓDIO 0,5 N..... 147

ANEXO 5

SOLUÇÃO DESS (250 ML)149

ANEXO 6

CHAVE PICTÓRIA PARA IDENTIFICAÇÃO DE FAMÍLIAS
(COLLEMBOLA, ENTOGNATHA) (GISIN, 1960).....150

ANEXO 7

CHAVE PICTÓRIA PARA IDENTIFICAÇÃO DE FAMÍLIAS
(COLLEMBOLA; SAUTTER, 1994)151

ANEXO 8

CHAVE PARA IDENTIFICAÇÃO DE ALGUMAS FAMÍLIAS
DE OLIGOCHAETA (TALAVERA, 1990)152

CAPÍTULO I

NOÇÕES DE SEGURANÇA EM LABORATÓRIO

Jair Alves Dionísio

Diana Signor

O laboratório, independentemente do tipo de atividade, é um local de trabalho onde as pessoas estão expostas a riscos físicos, químicos, biológicos, ergonômicos e, por isso, possui grande potencial para a ocorrência de acidentes. Em razão disso, são apresentadas neste capítulo algumas normas que devem ser seguidas pelos usuários visando a minimizar acidentes.

- a) Segurança de ordem pessoal
 - Evitar brincadeiras;
 - Utilizar roupas adequadas: calça comprida, sapato fechado, jaleco de algodão com manga comprida e abotoado;
 - Não colocar alimentos nas bancadas, armários e geladeiras; e,
 - Não se alimentar, beber ou fumar nas dependências do laboratório.
- b) Segurança com produtos químicos
 - Listar os reagentes e verificar a disponibilidade antes de iniciar as atividades;
 - Antes de utilizar reagentes que não conheça, consultar a bibliografia adequada, como a ficha de informação e segurança de produtos químicos (FISPQ), e se informar sobre como manuseá-los e descartá-los;
 - Selecionar, com base na FISPQ, os Equipamentos de Proteção Individual (EPIs): a luva específica e os óculos de proteção, principalmente para substâncias que apresentam potencial carcinogênico;
 - Evitar danificar rótulos de reagentes;
 - Nunca abrir frascos de reagentes antes de ler o rótulo;
 - Não testar substâncias químicas pelo odor ou sabor;

- Nunca pipetar solução do frasco original, pois essa conduta pode inutilizá-la;
 - Identificar as soluções após o preparo, com no mínimo: nome ou fórmula da solução, concentração, data e responsável. Ex.: Hidróxido de sódio / NaOH 0,5 N; Data: 19/06/07; Luiz Antônio da Silva;
 - Não retornar reagentes aos frascos originais, mesmo que não tenham sido utilizados; e,
 - Para correto descarte de produtos químicos nas pias, consulte o *Guia de descarte de produtos químicos perigosos de laboratório*¹.
- c) Segurança com vidrarias
- Antes de iniciar qualquer atividade no laboratório que envolva vidrarias, é necessário listar as que serão utilizadas;
 - Não utilizar vidrarias trincadas ou quebradas;
 - Não utilizar pipetas como bastão de vidro;
 - Não utilizar material identificado por outro usuário, sem a devida permissão;
 - Nunca armazenar soluções em vidrarias de preparo: balão, proveta e béquer;
 - Nunca segurar vidrarias pelo “gargalo” e sim pelo bojo;
 - Nunca secar pipetas com pancadinhas ou solavancos; e,
 - Nunca pipetar com a boca e sempre utilizar pera insufladora, pipetador automático ou pipeta descartável de poliestireno.
- d) Segurança em laboratórios
- Em grande parte, os acidentes em laboratório estão associados à ocorrência de fogo, provenientes de produtos químicos inflamáveis ou falhas na rede elétrica. Em virtude disso, para evitar incêndios é fundamental localizar a chave geral de eletricidade do laboratório e aprender a desligá-la;
 - Verificar a existência de extintores de incêndio, confirmar se estão dentro do prazo de validade, reconhecer o seu tipo em função das classes de fogo e certificar-se da forma correta de utilizá-los;

¹Disponível em: http://www.unesp.br/proex/repositorio/programasproex/proema/gere/Guia_de_neutralizacao_quimicos.htm

- Certificar-se da tensão elétrica dos aparelhos antes de conectá-los à energia e mantê-los desconectados quando não estão em uso; e,
 - Comunicar todos os acidentes aos demais usuários do laboratório.
- e) Telefones de emergência
- Empresas ou instituições de ensino necessitam de orientações para atendimento emergencial de acidentes em laboratórios. Dessa forma, é fundamental que os números dos telefones de emergência (Tabela 1) estejam fixados em local visível, além do Serviço de informações de emergência: Pró-Química (0800 11 8270).

Tabela 1. Telefones de emergência.

Instituição	Telefone
Corpo de Bombeiros	
Polícia Militar	
Centro de Informações Toxicológicas	
Serviço Especializado de Segurança e Medicina do Trabalho	

CAPÍTULO II

AMOSTRAGEM E PREPARO DO SOLO

*Jair Alves Dionísio
Ida Chapaval Pimentel*

A base fundamental para estimar a densidade populacional microbiana ou a atividade biológica do solo é a maneira de realizar a sua amostragem, pois dela dependerão os resultados esperados e as interpretações para os mais diversos tipos de solo, sistemas de manejo e coberturas.

No tocante à biologia do solo, diferentemente da fertilidade, não existem parâmetros estabelecidos para se determinar o número de amostras por área. Recomenda-se retirar o maior número possível, para melhor representar a área, evitando-se erros por sub ou superestimação de valores. Para tal, podem ser seguidas as orientações utilizadas na avaliação da fertilidade do solo, na qual a área é dividida em subáreas homogêneas. Dessa forma, são utilizados como critérios para subdivisão da área: relevo, tipo de solo (cor, textura e profundidade), cobertura vegetal, uso de condicionadores, corretivos e/ou fertilizantes.

Após a divisão da área, obtêm-se subáreas homogêneas que podem atingir até 20 ha. De acordo com Serrat et al. (2002), serão realizadas coletas de amostras compostas por subárea. Cada amostra composta é formada por número variável de amostras simples, em função da dimensão da área (Tabela 2).

Outra definição importante é a determinação da profundidade de coleta das subamostras, devido às grandes diferenças nas formas de preparo do solo. Lynch (1986) e Catellan e Vidor (1990), observaram que no plantio direto as amostragens devem ser realizadas na camada superficial do solo (0 a 5 cm), pois é onde há maiores concentrações de matéria orgânica e biota do solo e, no plantio convencional, as amostragens devem explorar a camada mais profunda (0 a 20 cm).

Em áreas de cultivo agrícola ou em experimentos nos quais as culturas são semeadas com espaçamento definido (milho, soja e trigo, por exemplo), a amostragem deve ser feita nas entrelinhas, para não superestimar os parâmetros microbiológicos em consequência da adição de fertilizantes. Quando não há definição de linhas de plantio (campo nativo e pastagens, por exemplo), coletam-se amostras ao acaso.

Tabela 2. Número de subamostras por talhão/área.

Tamanho do talhão homogêneo	Número de amostras simples para formar uma amostra composta	Fonte
10 m ² a vários hectares	20	Comissão (1994)
Nunca superior a 20 hectares	20	Raij et al. (1997)
Menor ou igual a 10 hectares	10 a 20	IAPAR (1996)
Menor ou igual a 4 hectares (uniformes)	15	Machado (1999)

As ferramentas utilizadas na coleta de solo podem ser trados (calador, holandês e rosca), pá de corte e enxada. Porém, tem-se mostrado mais prático o uso do trado calador (forma de cilindro). É importante destacar que, após a seleção da ferramenta, esta seja a única a ser utilizada, para padronizar a coleta das amostras quanto à profundidade, o massa e o volume.

No campo, as amostras de solo são colocadas e homogeneizadas em baldes plásticos de polietileno (5 a 8 L), que devem estar limpos, isentos de fertilizantes, calcário e agroquímicos, e, de preferência, que estejam desinfetados com álcool 70 %. Posteriormente, aproximadamente 500 g de solo são transferidos para sacos plásticos de polietileno limpos e sem uso, com a devida identificação externa (local, cultura e data). Dos 500 g da amostra, aproximadamente 300 g devem ser utilizados para a caracterização físico-química do solo, na determinação dos parâmetros: pH, umidade gravimétrica, textura, macro e micronutrientes, para que os dados biológicos obtidos possam ser mais bem interpretados.

As amostras de solo coletadas dessa forma são denominadas *amostras perturbadas*, devido à sua homogeneização, e devem ser encaminhadas ao laboratório o mais rápido possível, mantidas em caixas de isopor contendo gelo (isolante térmico). É importante evitar vibrações e agitações para não causar alterações nos parâmetros a serem avaliados.

Antes das avaliações, é necessário retirar fragmentos de matéria orgânica visíveis a olho nu (raízes e folhas, por exemplo), que possam interferir diretamente nos resultados. Como nem sempre é possível realizar as análises após a chegada ao laboratório, Moreira e Siqueira (2006) recomendam que as amostras sejam mantidas em câmara fria (2 a 4 °C) por até quatro semanas ou a -20 °C (freezer) por períodos maiores. Para realizar as avaliações após períodos de armazenamento, é

necessário que as amostras sejam pré-incubadas à temperatura ambiente por um período de 24 a 48 h, para restabelecer o equilíbrio da atividade microbiana. Para o estudo da biomassa microbiana, os mesmos autores recomendam um período de oito dias de incubação no escuro.

CAPÍTULO III

BACTÉRIAS

Ida Chapaval Pimentel
Jair Alves Dionísio
Diana Signor

Os organismos procariotos são agrupados em dois domínios Bacteria e Archea. As principais diferenças entre eles estão na composição química, na atividade e no ambiente em que se desenvolvem. A composição química da parede celular das bactérias é constituída por peptidoglicano, que lhes dá forma, confere força e rigidez. Já as arqueas apresentam grande diversidade e não contêm peptidoglicano, além de possuir capacidade de se desenvolver em condições extremas de temperatura, salinidade e pressão.

As células bacterianas são constituídas por parede celular, membrana plasmática e algumas espécies possuem uma terceira camada externa denominada cápsula, formada por polissacarídeos com consistência de muco, o que lhes confere resistência. Flagelos e fímbrias também podem fazer parte da sua constituição (TORTORA et al., 2013).

De acordo com a composição química e a integridade da parede celular, as bactérias se dividem em: Gram-positivas e Gram-negativas. As Gram-positivas possuem uma espessa camada de peptidoglicano e ácidos teicoicos e as Gram-negativas possuem peptidoglicano e uma membrana externa composta de lipopolissacarídeos, lipoproteínas e fosfolipídios (TORTORA et al., 2013; DUNLAP, 2010). Reproduzem-se muito rápido por divisão simples (fissão binária) que pode acontecer em aproximadamente 20 minutos, como é o caso da *Escherichia coli*. Por isso, a partir de uma única bactéria pode-se chegar a cinco bilhões delas após 12 h de cultivo.

As bactérias são os seres vivos mais antigos da terra, estão amplamente distribuídas no ar, no solo e na água e são os micro-organismos mais simples, do ponto de vista estrutural, e de menor tamanho (0,2 a 2,0 mm de diâmetro e 2,0 a 8,0 mm de comprimento). Durante o processo de divisão celular, por fissão binária, o material genético (DNA), que não está envolvido por uma membrana, é duplicado e a célula se divide em duas (TORTORA et al., 2013).

Bactérias podem ser autotróficas ou heterotróficas. No solo, a maioria é heterotrófica e necessita de uma fonte de carbono orgânico para sua nutrição. De

acordo com as exigências de oxigênio, podem ser: aeróbias obrigatórias, anaeróbias facultativas, anaeróbias obrigatórias, anaeróbias aerotolerantes e microaerófilas (TORTORA et al., 2013; DUNLAP, 2010).

Quanto à forma, podem ser: arredondadas (cocos), alongadas ou em forma de bastonetes (bacilos), em forma de espiral (espiroquetas e espirilos) e em forma de vírgula (vibriões).

De acordo com Siqueira et al. (1993), a faixa de pH para o crescimento da maioria das bactérias varia de 6,5 a 7,5, podendo algumas espécies atingir limites extremos entre 0,5 e 9,5. Em função da faixa de temperatura, dividem-se em: psicrófilas, que podem desenvolver-se a 0 °C ou em temperaturas mais baixas; mesófilas, que se desenvolvem entre 15 e 25 °C; termófilas, que crescem na faixa de 40 °C; e, termófilas extremas, que crescem com temperatura acima de 60 °C.

A população de bactérias no solo é estimada em torno de 10^8 a 10^9 organismos por grama de solo (esse número varia conforme o método de contagem). Entretanto, devido ao tamanho reduzido, contribuem com menos da metade do carbono da biomassa microbiana (CBM) do solo, mas, mesmo assim, podem atingir valores de CBM entre 100 e 4.000 kg ha⁻¹ (GRISI, 1988).

As bactérias de importância agrícola, que fixam nitrogênio atmosférico, podem ser agrupadas em três categorias:

- 1) Simbiontes (nodulam leguminosas): *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*;
- 2) Associativas (vivem endofiticamente ou na rizosfera de gramíneas): *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Gluconobacter*; e,
- 3) De vida livre: *Beijerinckia*, *Derxia* e *Azotomonas*.

No entanto, os gêneros de maior ocorrência no solo são: *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Xanthomonas* e *Micrococcus* (EWEIS et al., 1999).

Catellan e Vidor (1990a) compararam a densidade populacional de bactérias heterotróficas do solo, expressas em unidade formadora de colônia (UFC g⁻¹) de solo, sob diferentes sistemas de cultivo em duas profundidades. Esses autores observaram na camada 0 a 5 cm, para os sistemas de cultivo: campo nativo, aveia+ervilhaca/milho+caupi e siratro, respectivamente 88×10^5 ; $12,5 \times 10^6$ e $15,3 \times 10^6$ e na camada 5 a 15 cm, respectivamente: 45×10^5 ; 75×10^5 e $82,9 \times 10^5$. Barros et al. (2010)

observaram em área de mineração e metalurgia de chumbo as seguintes densidades populacionais de bactérias: 1,97 a $34,53 \times 10^5$ e 7,6 a 103×10^4 (UFC g^{-1}) de solo seco, respectivamente para os solos Neossolo Litólico sobre mata nativa sem evidência de contaminação com Pb e Neossolo Litólico Quartzarênico com cobertura de samambaias (*Pteridium aquilinum*) e capim elefante (*Peninsetum purpureum*), com pilhas de rejeito na superfície do solo.

As bactérias exercem importante função na decomposição da matéria orgânica, na ciclagem de nutrientes, na fixação biológica de nitrogênio (simbiótica e assimbiótica, na agregação do solo), e no desenvolvimento de doenças, como também são indicadoras de qualidade do solo.

PROTOCOLO I

CONTAGEM DE BACTÉRIAS PELO MÉTODO DE SEMEADURA EM SUPERFÍCIE

1. Material

- a) Solo úmido coletado da camada superficial, obtido conforme o Capítulo II (p. 14);
- b) Vidrarias: Erlenmeyer de 250 mL, tubos de ensaio (16 x 1,5 cm) com rosca, placas de Petri (\varnothing 90 mm), alça de Drigalsky e esferas de vidro (\varnothing 2,00 mm);
- c) Equipamentos: agitador de frasco, estufa de esterilização, estufa de incubação, capela de fluxo laminar, autoclave, peagâmetro, esterilizador infravermelho ou bico de Bunsen ou lamparina, agitador de tubos e microscópio estereoscópio (lupa);
- d) Soluções: salina esterilizada (NaCl 0,85 %), meio de cultura de Thorton (Tabela 3);
- e) Outros: funil de plástico (\varnothing 10,0 cm), micropipeta de volume variável (10 a 100 μ L), peneiras autoclaváveis, peneira número 10 (abertura de 2,00 mm), lixeira para resíduos biológicos, luvas de proteção (nitrílica descartável), parafilm e gás butano; e,
- f) Alternativos: pipetas de 1,0 mL, algodão hidrofóbico e pera insufladora.

2. Metodologia

- a) Pesar 10,00 g de solo úmido, previamente tamizado, em peneira número 10, em duplicata, sendo uma parte destinada à contagem de bactérias e a outra para a determinação da massa de solo seco (item 3);
- b) Com um funil, transferir o solo para Erlenmeyer de 250 mL contendo cinco esferas de vidro e 90,0 mL de solução salina esterilizada (Anexo 1) (diluição 1:10);
- c) Dispersar as unidades formadoras de colônia (UFC) em agitador de frasco (usar \cong 3,4 G) durante 15 minutos e aguardar a precipitação das partículas maiores;
- d) Com uma micropipeta, contendo ponteira esterilizada, transferir 1,0 mL da suspensão para um tubo de ensaio contendo 9,0 mL de solução salina esterilizada e dispersar, no agitador de tubos ou manualmente, cinco vezes (diluição 1:100);

Tabela 3. Meio de cultura de Thorton.

Reagente	Quantidade (g L ⁻¹)
K ₂ HPO ₄	1,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,1
NaCl	0,1
FeCl ₃	0,002
KNO ₃	0,5
Asparagina	0,5
Manitol	1,0
Ágar	15,0
Água destilada q.s.p.	1.000,0 mL

Fonte: Parkinson et al. (1971).

Obs. Adicionar ciclohexamide (40 mg L⁻¹ de meio) esterilizado por filtração, dissolvido em 10 mL de água destilada, antes de verter em placas com o meio de cultura à temperatura de 45 a 50 °C.

- e) Com uma micropipeta contendo outra ponteira esterilizada, transferir 1,0 mL da solução anterior para outro tubo de ensaio contendo 9,0 mL de solução salina esterilizada e agitar manualmente cinco vezes (diluição 1:1.000);
- f) Repetir o item “e” duas vezes consecutivas para atingir as diluições 1:10.000 e 1:100.000;
- g) Descartar as ponteiras utilizadas em um béquer contendo solução de hipoclorito de sódio (NaClO 2,0 %) (Anexo 1) após cada transferência;
- h) Com uma micropipeta contendo ponteira esterilizada, transferir 0,1 mL das etapas “e”, “f” e “g” para a superfície das placas de Petri, contendo o meio de cultura de Thorton;
- i) Espalhar o inóculo (0,1 mL) na superfície do meio com o auxílio da alça de Drigalsky, tomando o cuidado de esterilizá-la por flambagem, inserindo-a em álcool etílico (95 ou 96° GL) e passando-a imediatamente na chama da lamparina. Repetir o processo, após o uso em cada placa de Petri;

- j) Identificar as placas de Petri (tratamento, repetição, meio de cultivo, data e responsável), selar com parafilm e incubá-las em estufa a 25 °C, invertidas, por aproximadamente uma semana;
- k) Selecionar as placas de Petri com as diluições que contenham entre 20 e 200 (UFC) isoladas; e,
- l) Contar as UFC com contador de colônias ou a olho nu.

3. Cálculo

$$\text{UFC g}^{-1} = (\text{média das contagens} \times \text{diluição selecionada} \times 10) \text{ g}^{-1*}$$

*Obtido após a secagem do solo úmido em estufa (105 °C) até massa constante.

4. Resultados

Tabela 4. Densidade populacional de bactérias em diferentes solos.

Solo	Diluição selecionada	Unidades formadoras de colônias (UFC g ⁻¹)			Média
		Repetições			
		1	2	3	
A					
B					
C					
D					
E					

CAPÍTULO IV

BACTÉRIAS ESPORULADAS

Ida Chapaval Pimentel
Jair Alves Dionísio
Diana Signor

Algumas bactérias, quando em condições ambientais adversas, iniciam um processo em que a célula se desidrata e forma-se uma parede espessa, dentro da membrana celular, ao redor de seu citoplasma e cromossomo, formando uma estrutura conhecida como endósporo (esporo bacteriano). As bactérias que formam esses endósporos são conhecidas como bactérias esporuladas (BROCK, 2012).

Os endósporos bacterianos são capazes de permanecer em estado latente, desidratados, por longos períodos de tempo e sobreviver em condições de escassez de umidade, temperatura elevada, presença de ácidos e álcalis e falta de nutrientes. Quanto à necessidade de oxigênio, as bactérias esporuladas podem ser aeróbias estritas, anaeróbias facultativas, anaeróbias obrigatórias ou microaerófilas (TORTORA et al., 2013). Os principais gêneros que formam endósporos são *Bacillus* e *Clostridium*.

Cada endósporo contém uma cópia completa do cromossomo bacteriano, concentrações mínimas restritas de proteínas, alta concentração de cálcio e é circundado por uma parede de peptidoglicano, córtex (pseudopeptidoglicano), capa (queratina) e membrana lipoproteica. Este revestimento é responsável pela resistência a muitas substâncias agressivas (TORTORA et al., 2013).

O endósporo é uma estrutura que não apresenta metabolismo, podendo ser reativada quando as condições ambientais voltam a ser favoráveis. Por exemplo, esporos com 7.500 anos de *Thermoactinomyces vulgaris*, isolados do lodo congelado, germinaram quando reaquecidos e colocados em um meio nutriente (TORTORA et al., 2013).

A germinação do esporo bacteriano pode ser comparada à germinação de uma semente. Entretanto, nas bactérias o esporo está relacionado à sobrevivência e não à reprodução. O endósporo não se divide e a célula-mãe origina, normalmente, apenas um esporo (TORTORA et al., 2013).

Após a coloração da célula e a observação em microscópio, o endósporo poderá ser classificado como terminal (em uma das extremidades), subterminal (próximo de uma das extremidades) ou central. Além da posição, a possibilidade de causar intumescimento na célula são características utilizadas para identificar a bactéria (BURTON; ENGELKIRK, 2005).

As bactérias esporuladas são bem conhecidas quando associadas a doenças, como é o caso do *Bacillus anthracis*, que causa “Antraz ou Antrax”, uma doença do gado, ovelhas e cavalos que pode ser transmitida ao ser humano. Outra bactéria de destaque é o *Bacillus thuringiensis*, patógeno microbiano de insetos, que quando esporula internamente forma cristais intracelulares de glicoproteínas tóxicas (toxinas), causando a paralisia do intestino do inseto e fazendo com que este pare de se alimentar (TORTORA et al., 2013). Porém, as espécies de *Clostridium*, que são anaeróbias, estão associadas às seguintes doenças: tétano, botulismo e gangrena gasosa, respectivamente, causadas por: *C. tetani*; *C. botulinum* e *C. perfringens*.

Ao avaliar a população microbiana do solo em diversos sistemas de cultura e em duas profundidades, Catellan e Vidor (1990) observaram maior proporção de endósporos em solos descobertos e justificaram esse fato como reflexo das condições adversas desse sistema para o desenvolvimento microbiano. Já no solo com a leguminosa siratro (*Macroptilium atropurpureum*), apesar do maior número de bactérias, ocorreu a menor proporção de endósporos entre os tratamentos analisados. A estabilidade desse sistema, associada à boa conservação da umidade, é responsável pela baixa porcentagem de endósporos. Os mesmos autores constataram que as condições se tornam mais adversas aos micro-organismos conforme aumenta a profundidade, aumentando o número de endósporos, conseqüentemente.

Dionísio (1996), trabalhando com a população microbiana em áreas de *Eucalyptus grandis*, encontrou uma variação de 14,1 a 39,9 % na proporção de esporos nas densidades populacionais bacterianas, sendo que os tratamentos com adubação mineral apresentaram maiores proporções do que aqueles que receberam composto orgânico e calagem. Além disso, a quantidade de endósporos atingiu valores máximos em períodos de estiagem, demonstrando que em condições adversas as bactérias esporuladas entram em repouso no solo, permanecendo inativas.

Devido à sua resistência a condições ambientais adversas, as bactérias esporuladas do solo apresentam grande potencial, juntamente com os demais parâmetros microbiológicos, para avaliar os impactos resultantes de ações antrópicas das mais diversas naturezas, desde uma simples adubação ou perda do horizonte do solo até o derramamento de produtos químicos.

PROTOCOLO II

CONTAGEM DE BACTÉRIAS ESPORULADAS PELO MÉTODO DE SEMEADURA EM SUPERFÍCIE (CLARK, 1965)

1. Material

- a) Solo úmido coletado da camada superficial, obtido conforme o Capítulo II (p. 14);
- b) Vidrarias: Erlenmeyer de 250 mL, tubos de ensaio (16 x 1,5 cm) com rosca, placas de Petri (Ø 90 mm), alça de Drigalsky, esferas de vidro (Ø 2,00 mm);
- c) Equipamentos: agitador de frasco, estufa de esterilização, estufa de incubação, capela de fluxo laminar, autoclave, banho-maria, peagâmetro, esterilizador infravermelho ou bico de Bunsen ou lamparina, agitador de tubos e microscópio estereoscópio (lupa);
- d) Soluções: salina esterilizada (NaCl 0,85 %) e meio de cultura de Thorton (Tabela 3);
- e) Outros: funil de plástico (Ø 10,0 cm), micropipeta de volume variável (10 a 100 µL), peneiras autoclaváveis, peneira número 10 (abertura de 2,00 mm), lixeira para resíduos biológicos, luvas de proteção (nitrílica descartável), parafilm e gás butano; e,
- f) Alternativos: pipetas de 1,0 mL, algodão hidrofóbico e pera insufladora.

2. Metodologia

- a) Pesar 10,00 g de solo úmido, previamente tamizado, em peneira número 10, em duplicata, sendo uma parte destinada à contagem de bactérias esporuladas e a outra para a determinação da massa de solo seco (item 3);
- b) Transferir o solo, com um funil, para um Erlenmeyer de 250 mL contendo cinco esferas de vidro e 90,0 mL de solução salina esterilizada (Anexo 1) (diluição 1:10);
- c) Dispersar as unidades formadoras de colônias (UFC) em agitador de frasco (usar \cong 3,4 G) durante 15 minutos e aguardar a precipitação das partículas maiores;
- d) Aquecer o Erlenmeyer, em banho-maria a 80 °C, por, no mínimo, 15 minutos, para que as formas vegetativas das bactérias sejam eliminadas;

- e) Com uma micropipeta, contendo ponteira esterilizada, transferir 1,0 mL da suspensão para um tubo de ensaio contendo 9,0 mL de solução salina esterilizada e agitar cinco vezes (diluição 1:100);
- f) Descartar as ponteiras utilizadas em um béquer contendo solução de detergente (Anexo 1) após cada transferência;
- g) Transferir, com outra ponteira esterilizada, 1,0 mL da solução anterior para outro tubo de ensaio contendo 9,0 mL de solução salina esterilizada e agitar 5 vezes (diluição 1:1.000);
- h) Repetir o item “g” novamente para atingir a diluição 1:10.000;
- i) Com outra ponteira esterilizada, pipetar 0,1 mL das etapas “e”, “g” e “h”, e transferir para a superfície das placas de Petri contendo meio de cultura Thorton (Tabela 3). Para cada diluição utilizar três repetições. Logo, serão feitas nove placas de Petri para análise posterior;
- j) Espalhar o inóculo na superfície do meio com o auxílio da alça de Drigalsky, tomando o cuidado de esterilizá-la por flambagem, inserindo-a em álcool etílico (95 ou 96° GL) e passando-a imediatamente na chama da lamparina. Repetir o processo, após o uso em cada placa de Petri;
- k) Identificar corretamente as placas de Petri, selar com parafilm e incubá-las em estufa a 25 °C, invertidas, durante 7 dias;
- l) Selecionar as placas de Petri com as diluições que contenham entre 20 e 200 (UFC) isoladas; e,
- m) Contar as UFC com contador de colônias ou a olho nu.

3. Cálculo

Realizar o cálculo conforme Capítulo III (p. 22).

4. Resultados

Preencher os dados conforme Tabela 4 (p. 22).

CAPÍTULO V

FUNGOS

Ida Chapaval Pimentel
Jair Alves Dionísio
Diana Signor

Os fungos são micro-organismos eucarióticos, pertencentes ao domínio Eucarya, podendo ser unicelulares (leveduras) ou multicelulares, micro ou macroscópicos. São os principais decompositores da natureza, desdobrando os produtos orgânicos e reciclando carbono, nitrogênio e outros compostos do solo (TORTORA et al., 2013).

A maioria dos fungos é multicelular formando uma rede de filamentos denominados hifas, as quais podem ser septadas ou asseptadas (cenocíticas). O conjunto de hifas recebe o nome de micélio, um tecido próprio dos fungos responsável por todas as funções vegetativas do organismo. O componente principal da parede celular dos fungos é a quitina, porém outros polissacarídeos como mananas, galactosanas e quitosanas substituem a quitina em algumas paredes celulares fúngicas (DUNLAP et al., 2010)

Quanto à nutrição e fisiologia os fungos não possuem pigmentos fotossintetizantes, crescem melhor em pH ácido, a maioria é aeróbico e quimio-heterotróficos (TORTORA et al., 2013).

A obtenção de alimento efetua-se por absorção, o micélio secreta enzimas extracelulares que digerem compostos orgânicos complexos. Em outras situações, o micélio emite haustórios, que são estruturas que penetram no tecido dos organismos hospedeiros absorvendo o alimento (TORTORA, 2013).

Os fungos se reproduzem de forma sexuada e assexuada. Ocorre o crescimento por meio da disseminação de filamentos de hifas, produção de esporos ou simples divisão celular, como nas leveduras com brotamento (DUNLAP et al., 2010). A sistemática de classificação dos fungos é baseada em aspectos macroscópicos (aspecto das colônias) e microscópicos (presença ou ausência de septos nas hifas e características dos esporos) e, recentemente, utilizando a filogenia molecular.

Estes micro-organismos estão agrupados no Reino Fungi, subdivididos nos Filos Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota e Basidiomycota (KIRK et al.,

2008). O Filo Chytridiomycota apresenta zoósporos móveis uniflagelados polarmente, pode ser parasito de plantas, algas e larvas de insetos, decompõem celulose, queratina e quitina (ex.: *Alomyces* e *Rhizophydium*). O Filo Zygomycota possui hifas não septadas, a estrutura de reprodução assexuada é o esporângio e o zigósporo é o esporo sexual. A maioria é saprofítica, alguns fitopatogênicos ou parasitas de outros fungos e englobam parte das endomicorrizas arbusculares (ex.: *Mucor*; *Rhizopus* e *Zygorhynchus*). O Filo Ascomycota possui hifas septadas, esporos sexuais denominados ascósporos e formam esporos de resistência: os clamidósporos ou esclerócios. Decompõe substâncias recalcitrantes, como celulose e lignina, formam líquens e micorrizas, sendo alguns fitopatógenos (ex.: *Endothia*, *Claviceps* e *Saccharomyces*). O Filo Basidiomycota apresenta hifas septadas, reprodução assexuada, produzindo conídios ou artrosporos, ou sexualmente, pela produção de um basídio com seus basidiósporos haplóides. São decompositores de materiais lenhosos, fitoparasitas, sendo representados pela maioria das ectomicorrizas, muitos cogumelos, inclusive os comestíveis (ex.: *Agaricus*, *Porta* e *Boletus*).

A partir da adoção de parâmetros moleculares para estudos filogenéticos, foi criado um grupo artificial denominado de fungos mitospóricos (antigo filo Deuteromycota), para agrupar aquelas espécies que possuem somente a fase de reprodução assexuada. Eles, muitas vezes, possuem também a alternativa do sexo denominada de ciclo parassexual ou parassexualidade. A maioria é saprófita, muitos são parasitas de plantas, animais e outros fungos e muitos deles são endofíticos (ex.: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*) (ARAÚJO et al., 2010).

Os fungos predominam em solos ácidos, onde há menor competição com bactérias e actinobactérias. São encontrados em faixas de pH variando de 2,0 a 9,0. A umidade ideal para o desenvolvimento está entre 60 e 70 % da capacidade de campo do solo. Toleram ampla faixa de temperatura, mas as espécies mesofílicas são predominantes nos solos. A dispersão dos esporos ocorre por diversos agentes como a água, o vento, as sementes, os insetos, outros artrópodos, e o homem (JONES; HARRISON, 2004).

Os fungos contribuem com a maior parcela da biomassa microbiana do solo, de 70 a 80 %, e podem atingir até 5 t ha⁻¹ (BRANDÃO, 1992). Apesar de apresentarem baixa densidade populacional (de 10⁴ a 10⁶ g⁻¹ de solo), possuem hifas de elevado comprimento e diâmetro, o que eleva a biomassa (ALEXANDER, 1980). Os principais gêneros que ocorrem no solo são *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Rhizoctonia*. Nakagawa e Andréa (2006) constataram densidade popula-

cional, (UFC g⁻¹) de solo, de fungos 7×10^2 , em solo contaminado com hexacloro benzeno (BHC), no entanto quando o solo recebeu adição de bagaço de cana-de-açúcar e cal essa densidade atingiu $15,35 \times 10^4$.

As principais funções dos fungos no solo são atividade quimioheterotrófica sobre os restos vegetais, formação de relações simbióticas mutualísticas (micorrizas) e parasíticas (doenças) na maioria das plantas e produção de antibióticos. São ainda agentes de controle biológico de fungos fitopatogênicos e nematoides fitoparasitas (ex.: *Arthrobotrys*, *Dactylaria* e *Dactyella*) (GRAMINHA et al., 2001), como também, indicadores de qualidade do solo.

PROTOCOLO III

CONTAGEM DE FUNGOS PELO MÉTODO DE SEMEADURA EM SUPERFÍCIE

1. Material

- Solo úmido coletado da camada superficial, conforme o Capítulo II (p. 14);
- Vidrarias: Erlenmeyer de 250 mL, tubos de ensaio (16 x 1,5 cm) com rosca, placas de Petri (Ø 90 mm), alça de Drigalsky e esferas de vidro (Ø 2,00 mm);
- Equipamentos: agitador mecânico, estufa de esterilização, estufa de incubação, capela de fluxo laminar, autoclave, peagâmetro, esterilizador infravermelho ou bico de Bunsen ou lamparina, agitador de tubos e microscópio estereoscópio (lupa);
- Soluções: salina esterilizada (NaCl 0,85 %) e meio de cultura de Martin (Tabela 5);
- Outros: funil de plástico (Ø 10,0 cm), micropipeta com ponteiros de 0,1 mL, peneira número 10 (abertura de 2,00 mm), luvas de proteção (nitrílica descartável), parafilm, pera insufladora, gás butano, lixeira para resíduos biológicos; e,
- Alternativos: pipetas de 1,0 mL, algodão hidrofóbico e pera insufladora.

Tabela 5. Meio de cultura de Martin (MENZIES, 1965).

Reagente	Quantidade (g L ⁻¹)
K ₂ HPO ₄	1,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5
Peptona	5,0
Dextrose	10,0
Rosa Bengala ¹	0,3
Ágar	15,0
Água destilada q.s.p.	1.000,0 mL

¹Dissolvida em 10 mL de água destilada antes de ser adicionada ao meio.

Obs.: Ajustar o pH para 5,4 com HCl diluído, antes da adição do ágar; Adicionar sulfato de estreptomicina (30 mg L⁻¹ de meio) esterilizado por filtração, dissolvido em 10 mL de álcool etílico a 1 %, antes de verter em placas, com o meio de cultura à temperatura de 45 a 50 °C.

2. Metodologia

- a) Pesar 10,00 g de solo úmido, previamente tamizado, em peneira número 10, em duplicata, sendo uma parte destinada à contagem de fungos e a outra para a determinação da massa de solo seco (item 3);
- b) Transferir o solo, com um funil, para um Erlenmeyer de 250 mL contendo cinco esferas de vidro e 90 mL de solução salina esterilizada (Anexo 1) (diluição 1:10);
- c) Dispersar as unidades formadoras de colônias (UFC) em agitador mecânico (usar \cong 3,4 G) durante 15 minutos e aguardar a precipitação das partículas maiores;
- d) Com uma micropipeta, contendo ponteira esterilizada, transferir 1,0 mL da suspensão para um tubo de ensaio contendo 9,0 mL de solução salina esterilizada e agitar, no agitador de tubos ou manualmente, cinco vezes (diluição 1:100);
- e) Transferir com uma micropipeta, contendo outra ponteira esterilizada, 1,0 mL da solução anterior para outro tubo de ensaio contendo 9,0 mL de solução salina esterilizada e agitar manualmente cinco vezes (diluição 1:1.000);
- f) Repetir o item “e” novamente para atingir a diluição 1:10.000;
- g) Após cada transferência, descartar a ponteira utilizada em um béquer contendo solução de detergente (Anexo 1);
- h) Pipetar, com ponteiras diferentes, 0,1 mL das etapas “d”, “e” e “f” e transferir para placas de Petri contendo o meio de cultura de Martin, específico para fungos (Tabela 5);
- i) Espalhar o inóculo na superfície do meio específico com o auxílio da alça de Drigalsky, tomando o cuidado de esterilizá-la por flambagem, inserindo-a em álcool etílico (95 ou 96° GL) e passando-a imediatamente na chama da lamparina. Repetir o processo, após o uso em cada placa de Petri;
- j) Identificar as placas de Petri (tratamento, repetição, meio de cultivo, data e responsável), selar com parafilm e incubá-las em estufa a 25 °C, invertidas, por aproximadamente uma semana;
- k) Selecionar as placas de Petri com as diluições que contenham entre 20 e 200 (UFC) isoladas; e,
- l) Contar as UFC com contador de colônias ou a olho nu.

3. Cálculo

Realizar o cálculo conforme descrito no Capítulo III (p. 22).

4. Resultados

Preencher os dados conforme Tabela 4 (p. 22).

CAPÍTULO VI

MICORRIZAS ARBUSCULARES

Alessandra Monteiro de Paula

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) formam uma associação simbiótica mutualística com as raízes da maioria das plantas terrestres, originando as micorrizas arbusculares. Os FMA são atualmente classificados como um grupo monofilético, Filo Glomeromycota, Classe Glomeromycetes (glomeromicetos), organizados em quatro ordens, treze famílias, dezenove gêneros e, aproximadamente, 215 espécies (SOUZA et al., 2010). A participação desses fungos no processo de colonização do ambiente terrestre pelas plantas foi confirmada com a identificação da presença de três genes micorrízicos em um ancestral comum das plantas terrestres (WANG et al., 2006).

As micorrizas arbusculares (MA), associação simbiótica formada pelos FMA e as raízes das plantas, podem ser encontradas na maioria dos taxa vegetais, sendo a ausência da simbiose restrita a poucas famílias de plantas. Como exemplo, podem ser mencionadas as famílias Juncaceae, Caryophyllaceae e Brassicaceae (BERBARA et al., 2006), possivelmente em consequência do processo evolutivo, relacionado com algumas características peculiares como: a presença de compostos fungistáticos, a insuficiência de sinais moleculares ou fatores estimulantes para o estabelecimento da simbiose ou, ainda, a existência de barreiras físicas para a penetração da hifa do fungo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Descritos como simbiotróficos obrigatórios, os FMA apenas completam seu ciclo de vida na presença de um hospedeiro compatível. Essa característica limita os estudos de determinados tópicos da biologia desses fungos e, também, restringe a aplicação biotecnológica desses organismos (SOUZA et al., 2010).

Os glomeromicetos são assexuados, formam esporos que variam de 22 a 1.050 µm de diâmetro, destacando-se entre os maiores do Reino Fungi, e formam micélio asseptado ou cenocítico, podendo ocorrer formação ocasional de septos em alguns estágios do desenvolvimento de alguns gêneros (SOUZA et al., 2010), distribuídos em hifas externas que se ramificam, ocupando os espaços entre as partículas do solo e hifas intrarradiculares, que colonizam os tecidos das raízes das plantas.

Ao colonizar essas raízes, os FMA não promovem alterações morfológicas visíveis a olho nu e para confirmação da presença da simbiose são necessárias observações microscópicas de raízes clarificadas e coloridas com corantes específicos para micorrizas arbusculares (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

As raízes das plantas que fazem a associação micorrízica são colonizadas pelas hifas dos FMA que ocupam o apoplasto e as células do córtex, preenchendo o espaço intercelular e também intracelular, que resulta da invaginação da membrana plasmática vegetal e da formação de uma hifa modificada morfológica e fisiologicamente, denominada de arbúsculo, que conduz a troca de nutrientes e de fotoassimilados entre os simbiosites. Em algumas espécies de Glomeraceae, as hifas intrarradiculares se diferenciam e formam estruturas ricas em lipídios, denominadas de vesículas, com aparente função de reserva (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Para o estabelecimento da simbiose entre os FMA e as plantas, é necessária a presença de propágulos infectivos no solo, que podem ser segmentos de raízes de plantas colonizadas, hifas ou esporos de FMA.

Siqueira et al. (1994) propuseram uma sequência de procedimentos para a avaliação da ocorrência e das relações ecológicas das micorrizas arbusculares, na qual a partir da coleta de amostra de solo e raízes são indicadas algumas avaliações como: extração de esporos do solo, contagem dos esporos e montagem de lâminas para caracterização e identificação de espécies. A partir dessas mesmas amostras de solo podem ser montados vasos com culturas-armadilha, para multiplicação de esporos não identificados na extração da amostra original e, ainda, podem ser feitos estudos das raízes de plantas para avaliação da colonização dos FMA por meio do método de clarificação e coloração das raízes.

Os benefícios das micorrizas arbusculares no desenvolvimento das plantas são (SILVEIRA, 2000):

- a) Efeito no crescimento das plantas: consequência de seu efeito sobre a nutrição mineral, principalmente no aumento da absorção do fósforo e de outros elementos (Zn, Cu, Ca e S);
- b) Efeito na relação água-planta: plantas micorrizadas são mais resistentes ao estresse hídrico e usam a água absorvida com mais eficiência;
- c) Efeito na fixação de N_2 : leguminosas com dupla simbiose (rizóbio e MA) apresentam maior nodulação, atividade da nitrogenase e concentração de leghemoglobina, e teor de nitrogênio;

- d) Efeito sobre fitopatógenos: pode atuar como agente de controle biológico;
- e) Efeito na estrutura do solo: pela agregação das partículas e da estabilização dos agregados; e,
- f) Efeitos anatômicos e fisiológicos: por meio de modificações anatômicas, histoquímicas, bioquímicas e fisiológicas.

A importância das micorrizas para o crescimento vegetal e a revegetação de áreas degradadas é determinada por algumas condições predominantes do ambiente, como o baixo nível de nutrientes e água disponíveis no solo. Diversas espécies de FMA têm sido encontradas nas mais variadas situações de áreas degradadas no Brasil, o que evidencia a alta capacidade de adaptação desse grupo de fungos a condições adversas (SIQUEIRA et al., 2010).

PROTOCOLO IV A

EXTRAÇÃO DE ESPOROS DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES DO SOLO PELO MÉTODO DO PENEIRAMENTO ÚMIDO (GERDEMANN; NICOLSON, 1963) E DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE ESPOROS DE FMA EM AMOSTRA DE SOLO

1. Material

- a) Solo úmido coletado da camada superficial, obtido conforme o Capítulo II (p. 14);
- b) Vidrarias: provetas de 50 mL, bastão de vidro e placas de Petri (Ø 85 mm);
- c) Equipamentos: centrífuga de bancada, de no mínimo 3.000 RPM, e microscópio estereoscópio (lupa);
- d) Solução: sacarose 50 %; e,
- e) Outros: conjunto de peneiras (malhas de 750, 250, 100 e 45 μm), com suporte para sustentar o jogo de peneiras, béqueres plásticos de 50 e 2.000 mL ou recipiente de plástico de volume semelhante, tubos plásticos de 50 mL com rosca para centrífuga, pisseta, luvas de proteção (nitrila descartável) e lixeira para resíduos biológicos.

2. Metodologia

- a) Medir 50 mL de solo úmido e transferi-lo para um béquer de 2.000 mL ou recipiente de volume semelhante;
- b) Acrescentar 1 L de água potável e agitar com um bastão de vidro, até formar uma suspensão de solo;
- c) Dispensar a suspensão no jogo de peneiras, devidamente disposto da maior para a menor e abertura das malhas de 750, 250, 100 e 45 μm ;
- d) Transferir, com uma pisseta com água, o material retido nas peneiras (malhas de 250, 100 e 45 μm) para tubos de centrífuga de 50 mL, devidamente identificados, completar o volume para 50 mL e centrifugar, por 3 minutos, a 3.000 RPM;
- e) Descartar o sobrenadante, acrescentar solução de sacarose 50 % para resuspende o material depositado no fundo do tubo e centrifugar novamente por 2 minutos a 2.000 RPM;

- f) Dispensar o sobrenadante de cada tubo, em separado, em peneira (malha de 45 μm), lavar o material para retirar o excesso de sacarose e conduzir os esporos para avaliação em placas de Petri ou armazenar a 4 °C por até 30 dias, para leitura posterior;
- g) Para a contagem do número de esporos em cada amostra de cada malha, determinar, inicialmente, com uma régua graduada, a área do campo visual do microscópio estereoscópico que será utilizado para a contagem de esporos de FMA;
- h) Determinar a área da placa de Petri que será utilizada para depositar os esporos de FMA, conduzir a contagem do número de esporos e calcular a relação entre a área da placa de Petri e a área do campo visual do microscópio estereoscópico. Essa relação indicará o número total de campos visuais que podem ser observados na placa de Petri. Por exemplo, tomando-se como diâmetro do campo visual do microscópio estereoscópico a medida de 5 mm, no aumento de 4 X, a área do campo visual será de 19,6 mm². Considerando o diâmetro da placa de Petri de 85 mm, a área da placa de Petri será de 5.672 mm². Dessa forma, a relação entre a área da placa de Petri e do campo visual do microscópio estereoscópico será de $5.672/19,6 = 289$; e,
- i) Agitar o recipiente contendo os esporos de FMA e retirar uma alíquota de 5 a 10 mL para distribuir na placa de Petri. Uniformizar a distribuição da alíquota na placa de Petri antes de iniciar a contagem. Se na primeira contagem, no campo visual, forem observados menos de 30 a 40 esporos de FMA, devem ser selecionados, ao acaso, 40 campos visuais na placa de Petri e ser feita a contagem do número de esporos. Ao final da contagem, calcular a média dos 40 campos visuais e multiplicar pelo valor obtido no item h. Caso haja mais de 40 esporos na primeira contagem, diluir em água a alíquota da amostra que contém os esporos extraídos do solo na relação 1:1, agitar e remover uma nova alíquota para retomar a contagem de esporos.

3. Cálculo

$$(\text{N}^\circ \text{ de esporos de FMA}) \text{ g}^{-1} \text{ de solo} = [(\text{média dos 40 campos visuais} \times 289) \div \text{g}^*]$$

*Obtido após a secagem do solo úmido em estufa (105 °C) até massa constante.

4. Resultados

Tabela 6. Densidade de esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) nos diferentes solos.

Solo	Esporos (n° g ⁻¹)			Total
	250 mm	100 mm	45 mm	
A				
B				
C				
D				
E				

PROTOCOLO IV B

CLARIFICAÇÃO E COLORAÇÃO DE RAÍZES DE PLANTAS DE ACORDO COM (BRUNDRETT et al., 1996A) PARA AVALIAÇÃO DA TAXA DE COLONIZAÇÃO MICORRÍZICA PELO MÉTODO DE GIOVANNETTI E MOSSE (1980)

1. Material

- a) As raízes da planta que será avaliada deverão ser lavadas em água corrente para retirar o excesso de terra. A partir das raízes limpas, retirar de 1,00 a 2,00 g de raízes finas e jovens para conduzir os processos de clarificação e coloração;
- b) Vidrarias e materiais: béqueres de 25 ou 50 mL, placas de Petri (\varnothing 85 mm), lâminas e lamínulas;
- c) Equipamentos: banho-maria, autoclave ou chapa aquecedora e microscópio estereoscópio (lupa);
- d) Soluções: solução de KOH 10 % (utilizar recipiente resistente ao calor). Essa solução é utilizada para clarificação das raízes (solução de tinta de caneta tinteiro azul 5,0 %). Essa solução pode ser utilizada em substituição à solução de azul de tripiano, como solução de coloração; solução de hipoclorito de sódio 3 % (para retirar o excesso de corante das raízes); solução de 50 % de glicerol/água para retirar o excesso de corante e armazenar as raízes coloridas; e,
- e) Outros: pinças e agulhas, pisseta, luvas de proteção (nitrila descartável) e lixeira para resíduos biológicos.

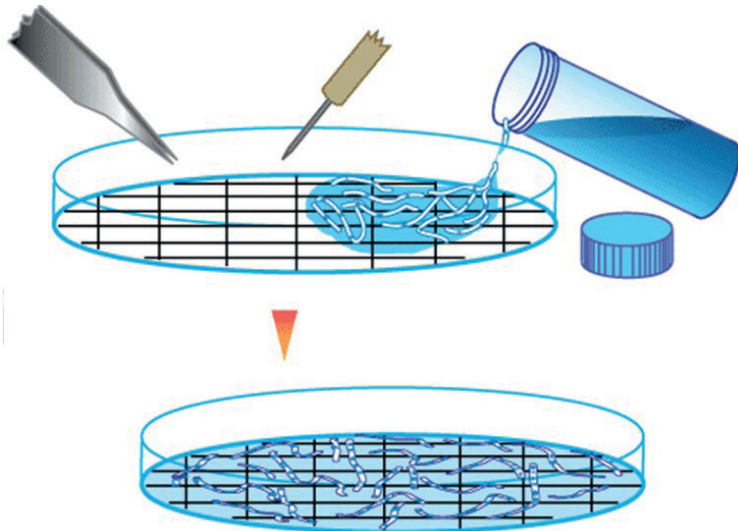
2. Metodologia

- a) Colocar as amostras de raiz em béquer de 25 ou 50 mL, individuais, para cada amostra ou em cápsulas plásticas perfuradas que permitam a entrada da solução, ou ainda, em redes de náilon com malha que possibilitem a entrada da solução e dispostas em recipiente maior que agrupe todas as cápsulas imersas na solução. A raiz deve permanecer imersa na solução de KOH 10 % (Anexo 1) e após aquecida em banho-maria, em

temperatura variando de 60 a 90 °C. O tempo de aquecimento e de permanência na solução de KOH pode variar entre espécies de planta, em função das características das raízes (as mais escuras e fibrosas demandam maior tempo para clarificação). Recomenda-se retirar uma amostra e avaliar em microscópio estereoscópico após um período de 15 a 30 minutos para raízes mais finas, como de gramíneas e, entre 45 e 60 minutos para raízes mais grossas, como de espécies arbóreas. Em alternativa ao banho-maria, é possível utilizar o autoclave para realizar essa etapa. De acordo com Brundrett et al. (1996a), 1 h a 60 °C em banho-maria equivale a 5 minutos em autoclave a 121 °C;

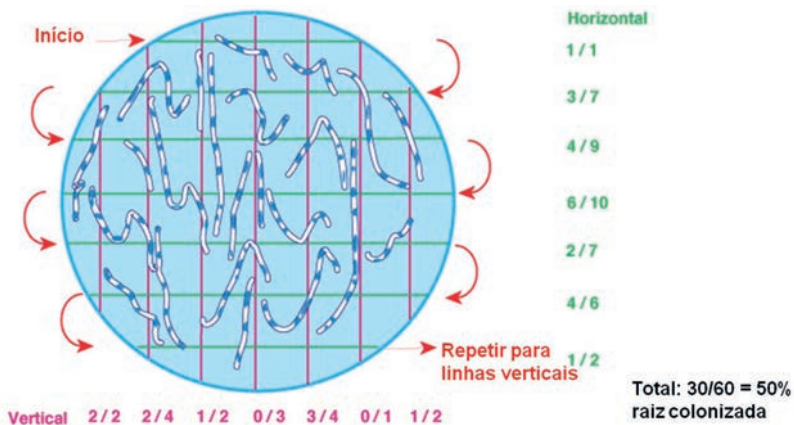
- b) Uma vez clarificadas, lavar a amostra em água ou em solução ácida diluída várias vezes antes de seguir para a etapa de coloração;
- c) Para coloração, a amostra deve ser imersa na solução contendo o corante solução de tinta de caneta 5 % (Anexo 1). Para acelerar o processo, a amostra pode ser novamente conduzida ao aquecimento, em banho-maria, recomendando-se o mesmo período de observação da eficiência do tempo de exposição ao corante, como descrito na etapa de clarificação, ou apenas deixada em repouso na solução corante por 12 h. A solução de coloração pode ser reutilizada de 5 a 10 vezes ou até perder a intensidade do corante, devendo-se ter o cuidado de filtrar com uma peneira de malha fina, após o uso na coloração de uma amostra;
- d) Após a coloração, as raízes estão prontas para avaliação da taxa de colonização micorrízica. A amostra deve ser retirada da solução de coloração e pode ser preservada em solução de glicerol 50 % (Anexo 1) em quantidade suficiente para cobrir as raízes;
- e) Uma vez coloridas, as raízes seguem para avaliação da colonização radicular e cálculo da porcentagem de colonização ou taxa de colonização micorrízica;
- f) As raízes devem ser dispostas de forma aleatória em uma placa de Petri de 8,5 cm de diâmetro, contendo um *grid* de linhas de 1,27 cm (Figura 1). Serão avaliados os fragmentos de raízes contendo estruturas fúngicas, com um microscópio estereoscópico ou microscópico fotônico;
- g) O observador visualizará, com o auxílio do microscópio estereoscópico, em cada campo visual, a intersecção da raiz com a linha horizontal do *grid* e anotar a presença ou ausência de colonização micorrízica do segmento da raiz que está em contato com a linha do *grid* (Figura 2); e,

- h) É recomendada a observação de no mínimo 100 intersecções de raízes com a linha do *grid* para avaliar uma amostra e ter segurança do resultado da taxa de colonização.



Fonte: <http://mycorrhizas.info/method.html#am1>.

Figura 1. Colonização micorrízica em placa de Petri pelo método de Giovannetti e Mosse (1980).



Fonte: <http://mycorrhizas.info/method.html#am1>.

Figura 2. Exemplificação da contagem da colonização micorrízica pelo método de Giovannetti e Mosse (1980).

3. Cálculo

% de colonização micorrízica = $\left[\frac{\text{pontos de raízes colonizadas}}{\text{pontos de raízes colonizadas} + \text{pontos de raízes não-colonizadas}} \right] * 100$

4. Resultados

Tabela 7. Taxa de colonização micorrízica em plantas.

Planta	Colonização micorrízica (%)
A	
B	
C	
D	
E	

CAPÍTULO VII

ACTINOBACTÉRIAS

Ida Chapaval Pimentel
Jair Alves Dionísio
Diana Signor

Os actinomicetos, atualmente denominados actinobactérias (BRENNER et al., 2004), são classificados dentro do Filo e da Classe Actinobacteria, que compreende seis ordens, 39 famílias, 139 gêneros e centenas de espécies. As actinobactérias compartilham duas características: todas são Gram positivas e apresentam alta razão de G + C (guanina/citosina) em seu DNA, podendo exceder 70 % do total de bases nucleotídicas, variando de 51 % em *Corynebacterias* a mais de 70 % em *Streptomyces* e *Frankias*. Podem ser aeróbias, microaerófilas ou anaeróbias (LACAZ et al., 2002).

Actinobactérias apresentam grande variedade morfológica, podendo ser cocoides (*Micrococcus*) ou cocobacilos (*Arthrobacter*), outros em forma de hifas curtas e rudimentares (*Nocardia* spp.) e, ainda, alguns com micélio ramificado (*Streptomyces* spp.) (VENTURA et al., 2007). Também, exibem diversas propriedades fisiológicas e metabólicas, tais como a produção de enzimas extracelulares e a formação de uma ampla variedade de metabólitos secundários. A maioria dos antibióticos utilizados atualmente são derivados de produtos naturais de actinobactérias e fungos (RAJU et al., 2010). Também, exibem diversas propriedades fisiológicas e metabólicas, tais como a produção de enzimas extracelulares e a formação de uma ampla variedade de metabólitos secundários (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

As actinobactérias possuem diferentes estilos de vida, assim o Filo inclui os patógenos humanos (*Mycobacterium* spp., *Nocardia* spp., *Tropheryma* spp., *Corynebacterium* spp. e *Propionibacterium* spp.), os habitantes do solo (*Streptomyces* spp.), os comensais de plantas (*Leifsonia* spp.), as fixadoras de nitrogênio simbiotes (*Frankia*) e as do trato gastrointestinal (*Bifidobacterium* spp.) (VENTURA et al., 2007).

As actinobactérias produzem elementos filamentosos em forma de micélio, semelhantes a hifas fúngicas (SCHLEGEL, 1993). Em algumas espécies, reproduzem-se pela formação de esporos, esporangiósporos ou conidiósporos. Os esporos constituem a sua principal forma de multiplicação, são resistentes a dessecações e podem auxiliar na sobrevivência das espécies durante a estiagem. Em

outros gêneros, como o *Nocardia*, a reprodução ocorre por meio da fragmentação das hifas em muitas células baciliformes e cocoides, cada uma capaz de formar um novo micélio (VENTURA et al., 2007).

A presença de actinobactérias *Streptomyces coelicoler* no solo é constatada pelo cheiro de terra molhada, que se deve à produção de geosmina, um álcool terciário (1,10-dimetil-9-decalol) que se acumula nos poros do solo (SIQUEIRA, 1993). Esse composto pode representar problemas para a aquicultura, indústria de alimentos, bebidas e água potável, pois o olfato humano pode detectá-la mesmo em baixas concentrações (4 a 15 ng L⁻¹) (CHAVEZ et al., 2011).

São predominantemente heterotróficas e utilizam fontes de carbono orgânico, que é utilizado desde as moléculas mais simples até as mais complexas não decompostas por fungos e bactérias como: fenóis, quitina, parafinas e húmus. São capazes de decompor matéria orgânica em temperaturas mais elevadas, como em compostagens e esterqueiras, e de degradarem celulose e proteínas com pequena imobilização de nitrogênio (RAMÍREZ; COHA, 2003). São fracos competidores em relação às bactérias e fungos, pois estes dois grupos são os primeiros decompositores que atacam com maior rapidez os resíduos orgânicos frescos adicionados ao solo, enquanto as actinobactérias aparecem em segundo plano e atacam os compostos de maior resistência (CAMPBELL; BIEDERBECK, 1982).

O pH é fator determinante para a maioria das espécies, sendo ótimo entre 6,5 e 8,0 e limitante para a maioria das espécies em 5,5. Valores de pH superiores a 5,5 favorecem o aparecimento da sarna comum da cultura da batata, importante doença causada por actinobactérias do solo (13 espécies de *Streptomyces*). Dentre as medidas de controle recomendadas para *S. scabies*, destacam-se: o uso de batatas-plantas saudáveis, a rotação de culturas com gramíneas, a manutenção do pH do solo abaixo de 5,5 e evitar o déficit hídrico durante a tuberação (FISCHER, 2007).

Os representantes do gênero *Frankia* vivem em simbiose com as raízes de plantas superiores de oito famílias pertencentes a sete ordens, envolvendo 24 gêneros e 279 espécies, distribuídas em todos os continentes (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A simbiose leva à formação de nódulos, no interior dos quais ocorre a fixação de nitrogênio, semelhante à fixação que ocorre entre rizóbios e leguminosas. As espécies actinorrizas compreendem desde ervas e arbustos até árvores dos gêneros: *Casuarina*, *Myrica*, *Alder* e *Eleagnus*, entre outros (AKKERMANS et al., 1992).

Dias-Júnior et al. (1998), avaliando o efeito da contaminação dos rejeitos de zinco sobre a população microbiana do solo, observaram que nos tratamentos:

a) com cobertura vegetal predominante de *Brachiaria decumbens*, sobre Latossolo Vermelho-Amarelo plúntico; b) com cobertura vegetal predominante de *Andropogon* sp., *Trema micrantha* e *Inga* sp. sobre Latossolo Vermelho, as densidades (UFC g⁻¹) de solo seco, de actinobactérias foram de $37,7 \times 10^4$ e 113×10^4 , respectivamente.

As actinobactérias são decompositoras de alguns componentes resistentes de tecidos animais e vegetais, contribuem para a formação do húmus, causam doenças em plantas (*Streptomyces scabies*) e animais (*Nocardia asteroides*), fixam N₂ e regulam a comunidade microbiana (TSAVKELOVA, 2007), como também são indicadoras da qualidade do solo.

PROTOCOLO V

CONTAGEM DE ACTINOBACTÉRIAS PELO MÉTODO DE SEMEADURA EM SUPERFÍCIE

1. Material

- Solo úmido coletado da camada superficial, obtido conforme o Capítulo II (p. 14);
- Vidrarias: Erlenmeyer de 250 mL, tubos de ensaio (16 x 1,5 cm) com rosca, placas de Petri (Ø 90 mm), alça de Drigalsky e esferas de vidro (Ø 2,00 mm);
- Equipamentos: agitador de frasco, estufa de esterilização, estufa de incubação, capela de fluxo laminar, autoclave, banho-maria, peagâmetro, esterilizador infravermelho ou bico de Bunsen ou lamparina e agitador de tubos; e,
- Soluções: salina esterilizada (NaCl 0,85 %) e meio de cultura caseínato-dextrose-ágar (Tabela 8);
- Outros: funil de plástico (Ø 10,0 cm), micropipeta de volume variável (10 a 100 µL), peneiras autoclaváveis, peneira número 10 (abertura de 2,00 mm), parafilm, lixeira para resíduos biológicos, luvas de proteção (nitrílica descartável) e gás butano; e,
- Alternativos: pipetas de 1,0 mL, algodão hidrofóbico e pera insufladora.

Tabela 8. Meio de cultura caseínato-dextrose-ágar (CLARK, 1965).

Reagente	Quantidade (g L ⁻¹)
Amido	10,0
Caseína	0,3
KNO ₃	2,0
NaCl	2,0
K ₂ HPO ₄	2,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01
Ágar	15,0
Água destilada q.s.p.	1.000,0

Obs. Ajustar o pH para 6,5 ou 6,6, com HCl diluído, antes da adição do ágar.

2. Metodologia

- a) Pesar 10,00 g de solo úmido, previamente tamizado, em peneira número 10, em duplicata, sendo uma parte destinada à contagem de fungos e a outra para a determinação da massa de solo seco (item 3);
- b) Transferir o solo, com um funil, para um Erlenmeyer de 250 mL contendo cinco esferas de vidro e 90,0 mL de solução salina esterilizada (Anexo 1) (diluição 1:10);
- c) Aquecer, em banho-maria a 50 °C, por 15 minutos;
- d) Dispersar as unidades formadoras de colônias (UFC) em agitador mecânico (usar \cong 3,4 G) durante 15 minutos e aguardar a precipitação das partículas maiores;
- e) Com uma micropipeta, contendo ponteira esterilizada, transferir 1,0 mL da suspensão para um tubo de ensaio contendo 9,0 mL de solução salina esterilizada e agitar, no agitador de tubos ou manualmente, cinco vezes (diluição 1:100);
- f) Transferir com uma micropipeta, contendo outra ponteira esterilizada, 1,0 mL da solução anterior para outro tubo de ensaio contendo 9,0 mL de solução salina esterilizada e agitar manualmente cinco vezes (diluição 1:1.000);
- g) Repetir o item “e” duas vezes consecutivas para atingir as diluições 1:10.000 e 1:100.000;
- h) Após cada transferência, descartar a ponteira utilizada em um béquer contendo solução de detergente (Anexo 1);
- i) Pipetar, com ponteiros diferentes, 0,1 mL das etapas “f” e “g” e transferir para placas de Petri contendo o meio de cultura caseinato-dextrose-ágar (Tabela 8);
- j) Espalhar o inóculo na superfície do meio específico com o auxílio da alça de Drigalsky, tomando o cuidado de esterilizá-la por flambagem, inserindo-a em álcool etílico (95 ou 96° GL) e passando-a imediatamente na chama da lamparina. Repetir o processo, após o uso em cada placa de Petri;
- k) Identificar corretamente as placas de Petri, selar com parafilm e incubá-las em estufa a 25 °C, invertidas, durante uma semana;
- l) Selecionar as placas de Petri com as diluições que contenham entre 20 e 200 (UFC) isoladas; e,
- m) Contar as UFC com contador de colônias ou a olho nu.

3. Cálculo

Realizar o cálculo conforme descrito no Capítulo III (p. 22).

4. Resultados

Preencher os dados conforme Tabela 4 (p. 22).

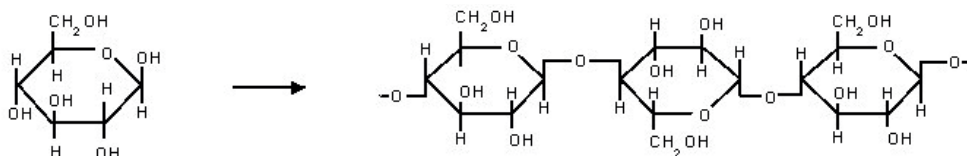
CAPÍTULO VIII

MICRO-ORGANISMOS CELULOLÍTICOS

Ida Chapaval Pimentel
Jair Alves Dionísio
Diana Signor

A celulose é o mais abundante composto orgânico presente na natureza, representando de 15 a 60 % da matéria seca dos vegetais incorporados ao solo. Encontra-se em plantas, sementes, algas, fungos e cistos de protozoários, sendo o principal componente dos vegetais, constituindo, por exemplo, quase 100 % do algodão (CARVALHO et al., 2009).

Celulose é um carboidrato composto de unidades de anidroglicose unidas pelas ligações β 1-4 nos átomos de carbono, com número variável entre 2.000 e 10.000 unidades por molécula e, em alguns casos, atingindo até 15.000 unidades, em longa cadeia linear não ramificada (CERRI et al., 1993). Possui fórmula empírica $(C_6H_{10}O_5)_n$, com um valor mínimo de $n = 200$. A estrutura da molécula de celulose pode ser visualizada na Figura 3:



Fonte: Polymer (2013).

Figura 3. Estrutura química da molécula de celulose.

A celulose tem uma estrutura linear ou fibrosa, na qual se estabelecem múltiplas pontes de hidrogênio entre os grupos hidroxilas das distintas cadeias justapostas de glicose, fazendo-as impenetráveis à água e originando fibras compactas que constituem a parede celular dos vegetais (CERRI et al., 1993). É um dos principais constituintes da parede celular das plantas (cerca de 33,0 % da massa da planta). Em combinações com a lignina, a hemicelulose e a pectina não são digeridas pelo homem, constituindo uma fibra dietética (SEABRIGHT, 1995), porém, animais ruminantes, como bovinos, girafas e camelos, podem digerir a celulose com uma bactéria celulolítica do gênero *Celulomonas*.

O conteúdo de celulose das plantas superiores nunca é fixo e a concentração varia com a idade e a espécie da planta. É especialmente abundante em materiais lenhosos, na palha, restolho e folhas.

Grande parte das populações microbianas heterotróficas do solo é representada por bactérias, fungos e actinobactérias, e caracteriza-se pela habilidade de decompor celulose, utilizando-a como fonte de carbono e energia. Esses micro-organismos constituem um grupo funcional denominado micro-organismos celulolíticos.

A degradação da celulose no solo se dá pelo complexo enzimático denominado celulase, produzido por bactérias aeróbias e anaeróbias, actinobactérias e fungos, sendo estes os principais agentes de degradação (CATELLAN; VIDOR, 1990a). A celulase é uma mistura de enzimas envolvidas na degradação da celulose. Os três maiores grupos de celulase que participam da hidrólise são: endoglucanase, hexoglucanase ou cellobiohydrolase e betaglucosidase (SUN; CHANG, 2002).

Em ambiente aeróbio, os micro-organismos oxidam a glicose via ciclo dos ácidos tricarbóxicos (CTA) e a decomposição resulta na produção de CO_2 e substância celular, com a participação de todos, principalmente dos fungos, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium*, *Paecolomyces*, *Penicillium* e *Trichoderma* (LYND et al., 2002). As principais bactérias aeróbias produtoras de celulase, que desdobram a celulose, são *Cellulomonas*, *Bacillus subtilis*, *B. polymyxa*, *B. brevis*, *B. licheniformis* e *B. cereus*. Entre as actinobactérias, destacam-se as termofílicas *Thermomonospora* e *Thermoactinomyces* e a mesofílica *Streptomyces* (SINGH; HAYASHI, 1995).

As actinobactérias são estimuladas somente no final da decomposição dos resíduos orgânicos, por apresentarem desenvolvimento mais lento (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Silva Filho e Vidor (1984) constataram que a maior população de micro-organismos celulolíticos, no Rio Grande do Sul, ocorreu em solos com pastagem cultivada (10^3 UFC g^{-1} de solo), superior ao solo submetido a diferentes sistemas de manejo convencional, plantio direto, rotação de culturas e campo nativo.

Dionísio (1996), trabalhando em áreas de cultivo de *Eucalyptus grandis* com calagem, adubação mineral e orgânica, e combinações das formas de adubação, constatou que as densidades de micro-organismos celulolíticos na camada do solo de 0,0 a 5,0 cm foram superiores nos tratamentos que receberam adubação orgânica.

PROTOCOLO VI

CONTAGEM DE MICRO-ORGANISMOS CELULOLÍTICOS PELO MÉTODO DE SEMEADURA EM SUPERFÍCIE

1. Material

- Solo úmido coletado da camada superficial, obtido conforme o Capítulo II (p. 14);
- Vidrarias: Erlenmeyer de 250 mL, tubos de ensaio de 15 mL com rosca, placas de Petri e alça de Drigalsky;
- Equipamentos: agitador mecânico, estufa de esterilização, estufa de incubação, capela de fluxo laminar, autoclave, peagâmetro, esterilizador infravermelho ou bico de Bunsen ou lamparina e agitador de tubos;
- Soluções: salina esterilizada (NaCl 0,85 %) e meio de cultura celulose-água (Tabela 9);
- Outros: funil plástico (Ø 10,0 cm), micropipetas com ponteiros de 0,1 mL, peneira número 10 (abertura de 2,00 mm), lixeira para resíduos biológicos, luvas de proteção (nitrílica descartável), parafilm, pera insufladora e gás butano; e,
- Alternativos: pipetas de 1,0 mL, algodão hidrofóbico e pera insufladora.

Tabela 9. Meio de cultura celulose-água.

Reagente	Quantidade (g L ⁻¹)
NaNO ₃	0,5
K ₂ HPO ₄	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
Celulose*	12,0
Ágar	15,0
Água destilada q.s.p.	1.000,0

Fonte: Parkinson et al. (1971).

* Carboximetil celulose.

2. Metodologia

- a) Pesar 10,00 g de solo úmido, obtido conforme o Capítulo II (p. 14), previamente tamizado, em peneira número 10, em duplicata, sendo uma parte destinada à contagem de micro-organismos celulolíticos e a outra para a determinação da massa de solo seco (item 3);
- b) Transferir o solo, com um funil, para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 90,0 mL de solução salina esterilizada (Anexo 1) (diluição 1:10);
- c) Dispersar as unidades formadoras de colônias (UFC) em agitador mecânico ($\cong 3,4$ G) durante 15 minutos e aguardar a precipitação das partículas maiores;
- d) Com uma micropipeta, contendo ponteira esterilizada, transferir 1,0 mL da suspensão para um tubo de ensaio contendo 9,0 mL de solução salina esterilizada e agitar, no agitador de tubos ou manualmente, cinco vezes (diluição 1:100);
- e) Transferir com uma micropipeta, contendo outra ponteira esterilizada, 1,0 mL da solução anterior para outro tubo de ensaio contendo 9,0 mL de solução salina esterilizada e agitar manualmente cinco vezes (diluição 1:1.000);
- f) Repetir o item “e” novamente para atingir a diluição 1:10.000;
- g) Após cada transferência, descartar as ponteiras utilizadas em um béquer contendo solução de detergente (Anexo 1);
- h) Pipetar, com ponteiras diferentes, 0,1 mL das etapas “d”, “e” e “f” e transferir para placas de Petri contendo o meio de cultura celulose-ágar;
- i) Espalhar o inóculo na superfície do meio específico com o auxílio da alça de Drigalsky, tomando o cuidado de esterilizá-la por flambagem, inserindo-a em álcool etílico (95 ou 96° GL) e passando-a imediatamente na chama da lamparina. Repetir o processo, após o uso em cada placa de Petri;
- j) Identificar corretamente as placas de Petri, selar com parafilm e incubá-las em estufa a 25 °C, invertidas, durante 7 dias;
- k) Após 7 dias, considerar somente as colônias que formarem, ao seu redor, um halo transparente, que corresponde à celulose degradada;
- l) Selecionar as placas de Petri com as diluições que contenham entre 20 e 200 (UFC) isoladas; e,
- m) Contar as UFC com contador de colônias ou a olho nu.

3. Cálculo

Realizar o cálculo conforme descrito no Capítulo III (p. 22).

4. Resultados

Preencher os dados conforme Tabela 4 (p. 22).

CAPÍTULO IX

MICRO-ORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATO

*Ida Chapaval Pimentel
Jair Alves Dionísio
Diana Signor*

Entre os elementos essenciais, o fósforo (P) ocupa, após o nitrogênio (N), posição de destaque em relação à composição dos seres vivos, tendo em vista sua atuação estrutural, funcional e na transferência de energia. O fósforo ocorre no solo em quantidade total normalmente elevada, porém em baixas quantidades disponíveis para as culturas, principalmente nos solos tropicais. Diante dessas circunstâncias, a solubilização biológica causada pelos micro-organismos do solo surge como uma alternativa para elevar a disponibilidade de fósforo nessas regiões. Este fato tem despertado a atenção para a utilização desses micro-organismos como inoculante comercial ou no manejo de suas populações a fim de promover uma melhor utilização do P existente no solo ou daquele adicionado como fertilizante (SILVA FILHO; VIDOR, 2001).

Os micro-organismos solubilizadores de fosfato, que constituem um grupo funcional, estão presentes na maioria dos solos investigados e o processo de solubilização que realizam pode ser influenciado pelo tipo de solo, espécie e idade da planta. Com relação às plantas, há maior quantidade de bactérias solubilizadoras na rizosfera de leguminosas do que em gramíneas (NAHAS et al., 1994). Segundo Barroti e Nahas (2000), a população de micro-organismos solubilizadores varia de 10^5 a 10^6 células g^{-1} de solo seco em leguminosas forrageiras e de 10^3 a 10^6 células g^{-1} em gramíneas forrageiras.

Dentre os principais grupos microbianos que apresentam capacidade de solubilizar fosfato no solo destacam-se vários gêneros de bactérias, como *Bacillus*, *Thiobacillus*, *Mycobacterium*, *Micrococcus* entre outros; quanto aos fungos, os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Sclerotium* e *Rhizopus* apresentam atividade solubilizadora; para actinobactérias merece destaque o gênero *Streptomyces*. De acordo com Kucey (1983), os fungos são mais eficientes na solubilização do que as bactérias, mas estas são mais numerosas podendo atingir densidades populacionais de 10^5 a 10^7 por grama de solo.

Nahas et al. (1994), estudando micro-organismos solubilizadores de fosfato em diversos solos, avaliaram que o número de fungos solubilizadores em termos relativos (30,2 %) foi superior ao de bactérias (16,4 %). No mesmo estudo, afirmam ainda que os fatores que favorecem o aumento da população microbiana do solo também estimulam a população de solubilizadores.

De acordo com Eira (1992), o mecanismo básico de solubilização do fosfato se dá por três maneiras distintas: a) ácidos minerais fracos (H_2CO_3), formados a partir das excreções radiculares e do metabolismo respiratório dos micro-organismos; b) ácidos minerais fortes (HNO_2 , HNO_3 , H_2SO_4), formados pela oxidação do nitrogênio e do enxofre, respectivamente; c) ácidos orgânicos (cítrico, oxálico, glucônico entre outros), formados no metabolismo microbiano ou excretados pelas plantas superiores.

A mineralização do fosfato ocorre por ação das enzimas fosfatases, oriundas da atividade de plantas e de micro-organismos, sobre o fósforo orgânico, também liberando fosfato disponível às plantas. Fungos apresentam atividade principalmente da fosfatase ácida, enquanto que, em bactérias, predomina a ação da fosfatase alcalina (EIRA, 1992). Segundo Dionísio (1996), a taxa de solubilização é maior em solos com mais material energético, como restos de cultura, disponíveis aos micro-organismos, resultando numa maior produção de ácidos orgânicos.

Os elementos C, N, Fe, Ca e K apresentam funções que sugerem as suas participações no processo de solubilização de fosfatos. O efeito da fonte de N tem sido relacionado ao balanço de íons absorvidos (FERNANDES; SOUZA, 1990; DARRAH, 1993). De modo geral, a solubilização aumenta com a absorção de fontes amoniacais e diminui com as nítricas. Reduções nos níveis de Fe, Ca e K interferem na síntese de várias enzimas e a diminuição destas, provoca acúmulo de ácidos orgânicos que vão contribuir para a solubilização do fosfato no solo (SILVA FILHO, 2001).

O manejo agrícola do solo também contribui para o tamanho e a atividade da população microbiana. Todavia, os fatores que regulam a composição da população microbiana não são, ainda, plenamente conhecidos, sendo esta uma importante área a ser explorada pela pesquisa. Mais importante do que o número de solubilizadores é a determinação da atividade da população existente no solo (SILVA FILHO; VIDOR, 2001).

Silva Filho e Vidor (1984) avaliaram a população microbiana do solo, na camada de 0 a 20 cm de profundidade, submetido a diferentes sistemas de manejo, no município de Santo Ângelo-RS, e observaram que a densidade populacional,

UFC g⁻¹ de solo, de solubilizadores de fosfato foi: 13×10^4 ; 48×10^4 e 53×10^4 , respectivamente, solo erodido, plantio convencional e solo em recuperação.

Os micro-organismos solubilizadores de fosfatos inorgânicos representam um grande potencial para a agricultura em clima tropical, porém atualmente não é possível contar com essa tecnologia.

PROTOCOLO VII

CONTAGEM DE MICRO-ORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATO PELO MÉTODO DE SEMEADURA EM SUPERFÍCIE

1. Material

- a) Solo úmido coletado da camada superficial, obtido conforme o Capítulo II (p. 14);
- b) Vidrarias: Erlenmeyer de 250 mL, tubos de ensaio de 15 mL com rosca, placas de Petri, alça de Drigalsky;
- c) Equipamentos: agitador mecânico, estufa de esterilização, estufa de incubação, capela de fluxo laminar, autoclave, peagâmetro, esterilizador infravermelho ou bico de Bunsen ou lamparina, agitador de tubos;
- d) Soluções: salina esterilizada (NaCl 0,85 %), Meio de cultura dextrose-extrato de levedura (Tabela 10);
- e) Outros: funil de plástico (\varnothing 10 cm), micropipetas com ponteiras de 0,1 mL, peneira número 10 (abertura de 2,00 mm), parafilm, lixeira para resíduos biológicos, luvas de proteção (nitrílica descartável); gás butano; e,
- f) Alternativos: pipetas de 1,0 mL, algodão hidrofóbico e pera insufladora.

2. Metodologia

- a) Pesar 10,00 g de solo úmido, obtido conforme o Capítulo II (p. 14), previamente tamizado, em peneira número 10 em duplicata, sendo uma parte destinada à contagem de micro-organismos solubilizadores de fosfato e a outra para a determinação da massa de solo seco (item 3);
- b) Transferir o solo, com um funil, para um Erlenmeyer de 250,0 mL contendo cinco esferas de vidro e 90,0 mL de solução salina esterilizada (Anexo 1) (diluição 1:10);
- c) Dispersar as unidades formadoras de colônias (UFC) em agitador mecânico (usar \cong 3,4 G) durante 15 minutos e aguardar a precipitação das partículas maiores;
- d) Com uma micropipeta, contendo ponteira esterilizada, transferir 1,0 mL da suspensão para um tubo de ensaio contendo 9,0 mL de solução salina esterilizada e agitar, no agitador de tubos ou manualmente, cinco vezes (diluição 1:100);

Tabela 10. Meio de cultura dextrose-extrato de levedura.

Reagente	Quantidade (g L ⁻¹ ou mL L ⁻¹)
Glicose	10,0 g
Extrato de levedura	0,5 g
Solução MgSO ₄ .7H ₂ O (10 %)	2,0 mL
Solução CaCl ₂ (1 %)	2,0 mL
Solução NaCl (10 %)	1,0 mL
Solução de micronutrientes ¹	2,0 mL
Fe-EDTA ²	10,0 mL
KNO ₃	0,1 g
Ágar	15,0 g
Água destilada q.s.p.	1.000,0 mL

Fonte: Sylvester-Bradley et al. (1982).

¹Solução contendo 0,2 g de Na₂MoO₄.2H₂O; 0,235 g de MnSO₄.2H₂O; 0,28 g de H₃BO₃; 0,008 g de CuSO₄.5H₂O e 0,024 g de ZnSO₄.7H₂O em 200 mL de água destilada; ²Solução obtida pela dissolução de 3,72 g de Na-EDTA e 3,78 g de FeSO₄.7H₂O em 900 mL de água destilada aquecida a 80 °C até a dissolução completa, seguida de ajustamento do volume para 1.000 mL; Obs. Após a dissolução dos reagentes e antes da adição do ágar, corrigir o pH para 7,0, com solução diluída de NaOH (0,1 %). Antes de verter o meio, com temperatura de 45 a 50 °C, adicionar 50 mL da solução K₂HPO₄ a 10 % e 100 mL da solução de CaCl₂ a 10 %, esterilizadas separadamente.

- e) Transferir com uma micropipeta, contendo outra ponteira esterilizada, 1,0 mL da solução anterior para outro tubo de ensaio contendo 9,0 mL de solução salina esterilizada e agitar manualmente cinco vezes (diluição 1:1.000);
- f) Repetir o item “e” novamente para atingir a diluição 1:10.000;
- g) Descartar a ponteira utilizada em um béquer contendo água e detergente, após cada transferência;
- h) Pipetar, com ponteiras diferentes, 0,1 mL das etapas “d”, “e” e “f” e transferir para placas de Petri contendo o Meio de cultura dextrose-extrato de levedura. Para cada diluição usar três repetições. Logo, serão utilizadas nove placas de Petri para análise posterior;
- i) Espalhar o inóculo na superfície do meio específico com o auxílio da alça de Drigalsky, tomando o cuidado de esterilizá-la por flambagem, inse-

rindo-a em álcool etílico (95 ou 96° GL) e passando-a imediatamente na chama da lamparina. Repetir o processo, após o uso em cada placa de Petri;

- j) Identificar corretamente as placas de Petri, selar com parafilm e incubá-las em estufa a 25 °C, invertidas, durante uma semana;
- k) Após 10 a 12 dias, considerar somente as colônias que formarem, ao seu redor, um halo transparente, que corresponde à solubilização do fosfato;
- l) Selecionar as placas de Petri com as diluições que contenham entre 20 e 200 (UFC) isoladas; e,
- m) Contar as UFC com contador de colônias ou a olho nu.

3. Cálculo

Realizar o cálculo conforme descrito no Capítulo III (p. 22).

4. Resultados

Preencher os dados conforme Tabela 4 (p. 22).

CAPÍTULO X

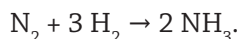
ISOLAMENTO DE RIZÓBIOS DE RAÍZES DE LEGUMINOSAS

*Jair Alves Dionísio
Ida Chapaval Pimentel
Diana Signor*

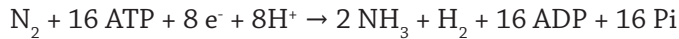
O nitrogênio é um nutriente requerido em grandes quantidades pelas plantas, representando 78 % da composição da atmosfera, porém encontra-se na forma elementar (N_2), utilizável apenas por determinadas espécies de micro-organismos procarióticos. Para assegurar a utilização pelos vegetais, é necessária que ocorra a redução deste elemento para a forma de amônia (NH_3), por meio do processo denominado fixação biológica de nitrogênio (FBN).

A FBN, uma reação bioquímica extraordinária que ocorre por ação da enzima nitrogenase, ocorre em micro-organismos diazotróficos e é o segundo processo biológico mais importante do planeta, perdendo apenas para a fotossíntese (SIQUEIRA; FRANCO, 1988). Pode ser realizada de forma simbiótica, definida por associações mutualistas entre micro-organismos fixadores de nitrogênio e espécies vegetais, quanto assimbiótica, promovida por micro-organismos fixadores de vida livre.

A quebra da tripla ligação covalente, presente na molécula de N_2 , demanda grande quantidade de energia e pode ser feita industrialmente ou por micro-organismos diazotróficos. O processo industrial é conhecido como reação de Haber-Bosch e utiliza temperaturas que variam de 400 a 600 °C e pressões superiores a 10^7 Pascal (de 100 a 200 atm), com utilização de energia de derivados de petróleo (HUNGRIA et al., 1994, 2006). A reação industrial é representada por:



Quando ocorre a FBN (N_2 reduzido a NH_3), também há um grande custo energético para o organismo que realiza a fixação. No entanto, devido à ação da nitrogenase, a reação pode ocorrer à temperatura e pressão atmosférica ambiente, com consumo de trifosfato de adenosina (ATP) e é representada por (HUNGRIA et al., 1994):



Os micro-organismos diazotróficos simbiotes com leguminosas pertencem à Ordem Proteobacteria, Classe Alphaproteobacteria, Família Rhizobiaceae: *Allorhizobium* spp., *Rhizobium* spp., *Ensifer* spp., Família Bradyrhizobiaceae: *Bradyrhizobium* spp., Família Phyllobacteriaceae: *Mesorhizobium* spp., Família Hyphomicrobiaceae: *Azorhizobium* spp., outros: *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Devosia*, *Herbaspirillum*, etc. Uma importante diferença entre eles é a espécie vegetal com a qual realizam simbiose. O gênero *Rhizobium*, por exemplo, associa-se com plantas de feijão e o *Bradyrhizobium* com plantas de soja. A simbiose caracteriza-se pela formação de nódulos, diferentemente da galha, causada por nematoides fitoparasitas. Em algumas culturas como soja, ervilha e trevo, leguminosas forrageiras, arbóreas e adubos verdes, o uso de inoculante comercial substituiu a adubação nitrogenada.

O tempo de formação dos nódulos nas leguminosas e o início da atividade da nitrogenase são variáveis, dependendo das espécies leguminosas e do rizóbio. A nitrogenase é sensível ao oxigênio, que pode destruí-la ou inativá-la irreversivelmente, sendo assim, cada organismo desenvolveu uma estratégia diferente para livrar-se do excesso de O_2 . No caso da simbiose rizóbio-leguminosas, a planta é induzida a produzir a leghemoglobina, que representa um sistema tampão para o O_2 , pois o transporta mantendo concentrações suficientes ao metabolismo aeróbio dos bacteroides e à síntese do ATP necessários à fixação, sem prejudicar a nitrogenase (NEVES; RUMJANECK, 1992).

A eficiência da fixação simbiótica do nitrogênio pode ser avaliada pelo aspecto do nódulo, levando-se em conta: forma, tamanho, cor interna e a maneira como eles se distribuem no sistema radicular da planta. Nódulos eficientes são relativamente grandes, pouco numerosos, de superfície rugosa, presentes na raiz principal e secundárias de primeira ordem e de coloração interna rósea-avermelhada (KUSDRA, 2002). A soja, quando bem nodulada, apresenta de 15 a 30 nódulos ou de 100 mg a 200 mg de nódulos secos por planta (HUNGRIA et al., 1994).

De forma resumida, as etapas do processo de formação do nódulo, segundo Freire (1992), podem ser assim compreendidas:

- 1) Liberação dos flavonoides pelas raízes das plantas;
- 2) Quimiotaxia do rizóbio em direção à superfície das raízes;
- 3) Aderência do rizóbio às raízes;
- 4) Encurvamento do pelo radicular e formação da via de infecção;

- 5) Múltipla infecção das células do nódulo e crescimento do nódulo;
- 6) Crescimento do nódulo e diferenciação dos bacteroides; e,
- 7) Começo da fixação simbiótica.

Diversos fatores podem interferir na FBN, atuando de forma limitante, reduzindo a eficiência do processo. Dessa forma, segundo Siqueira e Franco (1988), destacam-se os fatores bióticos (gens “nif”, especificidade hospedeira, capacidade competitiva), climáticos (temperatura, umidade e aeração), a fertilidade do solo (acidez e nutrientes minerais) e o uso de agrotóxicos.

Para que a soja alcance produtividade aproximada de 4.000 kg ha⁻¹ é necessário que seja utilizado um inoculante capaz de fornecer 1.200.000 células por semente, tratadas com fungicidas menos tóxicos, não seja aplicado nitrogênio mineral e os micronutrientes cobalto e molibdênio sejam fornecidos nas doses de 2,0 a 3,0 g ha⁻¹ e de 20,0 a 30,0 g ha⁻¹, respectivamente (EMBRAPA, 2009).

PROTOCOLO VIII

ISOLAMENTO DE RIZÓBIO DE RAÍZES DE PLANTAS LEGUMINOSAS

1. Material

- Raízes de plantas recém-colhidas, com nódulos frescos;
- Vidraria: placas de Petri, tubos de ensaio, bastão de vidro e lâminas;
- Equipamentos: microscópio fotônico, estufa de esterilização, estufa de incubação, capela de fluxo laminar, autoclave, peagâmetro, esterilizador infravermelho ou bico de Bunsen ou lamparina;
- Soluções: meio de cultura extrato de levedura-manitol-ágar-YMA (Tabela 11); e,
- Outros: bico de Bunsen ou lamparina, gás butano, pinça, peneira número 10 (abertura de 2,00 mm) pá, saco plástico, papel toalha e luva de proteção (nitrílica descartável).

Tabela 11. Meio de extrato de levedura-manitol-ágar-YMA (FRED; WAKSMAN, 1928) com adição do corante azul de bromotimol¹.

Reagente	Quantidade (g L ⁻¹)
Manitol	10,0
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2
NaCl	0,1
Extrato de levedura	0,5
Ágar	15,0
Água destilada q.s.p.	1.000,0

Obs.: Ajustar o pH final para 6,8; ¹Acrescentar azul de bromotimol (5 mL L⁻¹ de meio de cultura, Anexo 1)

2. Metodologia

2.1. Coleta de nódulos

- a) Selecionar a planta leguminosa;
- b) Demarcar um círculo ao redor da planta, correspondente à área do sistema radicular;
- c) Para leguminosas herbáceas como soja, feijão e guandu, recomenda-se fazer um círculo, em volta da planta, com cerca de 15 cm de raio;
- d) Para arbóreas, são necessários dois círculos: um próximo à raiz principal e outro mais distante, que se aproxime das raízes secundárias;
- e) Cavar a uma profundidade de 30 cm para plantas herbáceas e a uma profundidade maior para arbóreas;
- f) Remover a terra cuidadosamente para não danificar o sistema radicular; e,
- g) Retirar o excesso de solo com as mãos sobre uma peneira, cuidando para que os nódulos não se percam.

2.2. Isolamento do rizóbio

- a) Colocar as plantas ou raízes em sacos plásticos;
- b) Levar o material ao laboratório e lavar com água da torneira, com cuidado, sobre uma peneira (malha de 2,0 mm), para evitar que as raízes e os nódulos se percam;
- c) Secar as raízes com papel toalha e retirar os nódulos, deixando-se 0,5 cm de raiz para facilitar a manipulação do nódulo e diminuir as chances de danificá-lo durante o isolamento;
- d) Na capela de fluxo laminar, os nódulos dessecados devem ser reidratados, ficando de molho em frascos com água por 30 a 40 minutos;
- e) Imergir os nódulos por um período de 5 a 10 segundos em álcool 90-95 %, para quebrar a tensão superficial e remover bolhas de ar do tecido;
- f) Transferir os nódulos para uma solução de hipoclorito de sódio ou cálcio a 5,0 % (Anexo 1);
- g) Lavar os nódulos pelo menos cinco vezes em água destilada e esterilizada;
- h) Após a última lavagem, macerar os nódulos com bastão de vidro, aproveitando a água da última lavagem;

- i) Riscar o material em placas de Petri contendo meio de extrato de levedura-manitol-ágar-YMA;
- j) Incubar a 25-30 °C ou na temperatura ideal para a leguminosa da qual o nódulo foi coletado; e,
- k) Verificar diariamente o crescimento das colônias de rizóbio.

3. Resultados

Algumas características morfológicas e culturais do rizóbio em meio de cultura YMA com azul de bromotimol.

3.1. Características morfológicas das células de rizóbio (GILLER; WILSON, 1993)

- a) Realizar o teste de Gram, em solubilidade com KOH, para confirmar que os rizóbios são Gram negativos. Realizar observações ao microscópio fotônico com aumento de 1.000 vezes, para confirmar que são bastonetes curtos; e,
- b) Confirmar a presença de flagelos conforme WANG et al. (2008):
 - Polar ou subpolar. Ex.: *Bradyrhizobium*;
 - Peritríquios. Ex.: *Rhizobium* e *Azorhizobium*.

3.2. Características dos rizóbios relacionadas ao pH do meio de cultivo YMA com azul de bromotimol (MARTINS et al., 1997)

- Alcalinização, coloração azul do meio de cultivo e rizóbio de crescimento lento. Ex.: *Bradyrhizobium japonicum*;
- Acidificação, coloração amarela do meio de cultivo e crescimento rápido. Ex.: *Rhizobium tropici*; e,
- Inalteração, coloração verde do meio de cultivo e crescimento rápido. Ex.: *Albizia lebbbeck*.

3.3. Características culturais em meio de cultura YMA com azul de bromotimol

O rizóbio em meio rico de nutrientes não absorve o corante, diferenciando-se dos contaminantes.

- a) Tempo de crescimento das colônias incubadas em placas de Petri a 28 °C:
- Rápidas: até 3 dias;
 - Intermediárias: até 5 dias;
 - Moderadas: até 9 dias; e,
 - Lentas: igual ou superior a 10 dias.
- b) Diâmetro, aspecto e formato das colônias em meio de cultura YMA com azul de bromotimol:
- Inferior a 1,0 mm: opacas e puntiforme; e,
 - Superior a 1,0 mm: translúcidas com brilho, circulares no início do crescimento e irregulares quando mais velhas.

Obs.: Para a confirmação que o isolado é rizóbio, deve ser realizada a inoculação na leguminosa hospedeira, observando-se a formação de nódulos, ou a identificação por biologia molecular.

CAPÍTULO XI

INOCULAÇÃO DE SEMENTES DE LEGUMINOSAS

Diana Signor
Jair Alves Dionísio
Ida Chapaval Pimentel

Para que uma leguminosa seja cultivada, sem adição de adubo nitrogenado, mineral ou orgânico, é preciso que forme uma associação simbiótica mutualística com uma bactéria denominada rizóbio. Nessa associação, formam-se nódulos nas raízes da planta, que fornece energia na forma de carboidrato para a bactéria, que cede, em troca, nitrogênio amoniacal, fixado a partir do N_2 atmosférico.

A maneira mais prática de transferir rizóbio para a semente é por meio da inoculação. Segundo Brasil (2004), inoculante é todo material que possui micro-organismos, atua favoravelmente no desenvolvimento das plantas e contém bactérias vivas, específicas para cada espécie ou grupo de leguminosas.

Os inoculantes brasileiros para leguminosas devem atender às normas definidas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), conforme recomenda Embrapa (2011):

- A concentração de células deve ser superior a 1×10^9 células g^{-1} ou mL^{-1} e devem estar presentes no produto ao menos uma das quatro estirpes recomendadas (Semia 587; Semia 5019, Semia 5079 e Semia 5080);
- A quantidade mínima de inoculante a ser utilizada deve fornecer 1.200.000 células/semente;
- O volume de inoculante líquido a aplicar não deve ser inferior a 100 mL, sem qualquer diluição em água, por 50 kg de semente; e,
- A base de cálculo para o número de células por semente é a concentração do produto comercial registrada no MAPA impressa na embalagem do inoculante.

Existem inoculantes comerciais para leguminosas em duas formas físicas: sólidos (em pó, tendo a turfa como suporte para as bactérias), utilizados desde o

início do século XX, e fluídos (líquidos, com a bactéria estabilizada em seus processos metabólicos por protetores celulares). No início dos anos 1990, começaram a surgir os inoculantes líquidos, que hoje representam a maior parte do mercado nacional, em função da facilidade de sua aplicação.

São consagradas as seguintes vantagens do uso de inoculantes:

- Melhoria da qualidade do solo;
- Evita o uso de adubação nitrogenada;
- Proporciona economia aos agricultores;
- Aumenta a produtividade da lavoura; e,
- Não causa prejuízos ao meio ambiente.

A inoculação de sementes de leguminosas é feita com o objetivo de estabelecer uma população vigorosa de rizóbios em torno das raízes, sendo a inoculação simples e a peletização os principais métodos utilizados. A primeira consiste na aplicação do produto contendo as estirpes do rizóbio nas sementes antes da semeadura, sendo utilizado para leguminosas de sementes grandes como soja, feijão e amendoim, por exemplo, que são semeadas em áreas sem problemas de acidez ou deficiência nutricional e sob condições físicas favoráveis (umidade e temperatura). A segunda é utilizada principalmente com sementes de leguminosas forrageiras de tamanho pequeno (trevos, alfafa e estilosantes, por exemplo), semeadas a lanço; nelas o rizóbio pode encontrar no solo condições adversas que afetem sua sobrevivência, tais como baixa umidade, altas temperaturas, pH ácido e deficiência nutricional.

A peletização consiste em revestir sementes com material seco, inerte e de grão fino, como o carbonato de cálcio ou o fosfato de rocha, formando uma capa protetora. Esta estrutura protege o inoculante durante a fase que antecede a emissão de raízes, transporta nutrientes e possibilita que as sementes inoculadas sejam misturadas ao adubo. Além disso, permite a incorporação de inseticidas, fungicidas, fertilizantes e reguladores de crescimento (VIDOR et al., 1983).

A inoculação pode ser realizada nas sementes, com inoculante líquido ou turfoso, ou no solo. Nas sementes, realiza-se preferencialmente, em máquinas próprias, máquina de tratamento de sementes, betoneira ou tambor com eixo excêntrico, para garantir a maior aderência do inoculante à semente (EMBRAPA, 2011).

Para que a inoculação das sementes de leguminosas tenha sucesso, algumas medidas devem ser adotadas, dentre as quais destaca-se a aplicação de micro-

nutrientes e o uso de fungicidas. Para a cultura da soja, recomenda-se de 2,0 a 3,0 g ha⁻¹ de cobalto e de 12,0 a 30,0 g ha⁻¹ de molibdênio via semente ou em pulverização foliar, nos estádios de desenvolvimento V3 (3º internódio) a V5 (5º internódio) (EMBRAPA, 2013).

Para minimizar o efeito de doenças do solo e outras transmitidas pelas sementes, é necessário, na maioria das vezes, utilizar fungicidas. Porém, muitos apresentam toxicidade ao rizóbio, causando expressiva mortalidade. Como alternativa menos prejudicial ao rizóbio, são recomendadas pela Embrapa (2013) as seguintes misturas:

- Carboxin + Thiram;
- Difenoconazole + Thiram;
- Carbendazin + Captan;
- Thiabendazole + Tolyfluanid; e,
- Carbendazin + Thiram.

Alguns cuidados devem ser adotados para se obter sucesso na inoculação:

- Certificar-se de que o inoculante tenha sido guardado em geladeira até a sua utilização;
- Utilizar somente inoculantes dentro do prazo de validade;
- Abrir os pacotes somente quando for realizar a inoculação das sementes;
- Espalhar bem e rapidamente as sementes após a inoculação; e,
- As sementes após inoculadas devem ser preservadas do sol e das altas temperaturas, cobrindo-as com solo imediatamente após a semeadura.

PROTOCOLO IX

INOCULAÇÃO DE SEMENTES DE LEGUMINOSAS

1. Material

- a) Sementes de soja e trevo;
- b) Inoculante turfoso e líquido;
- c) Soluções: goma caseira 7,0 % (adesivo) e sacarose (10,0 %); e,
- d) Outros: bandejas, sacos plásticos, calcário ou fosfato de rocha, espátula, luva de proteção (nitrílica descartável) e lixeira para resíduos biológicos.

2. Metodologia

2.1. Inoculação Simples – Inoculante turfoso

- a) Misturar separadamente a solução de sacarose a 10,0 % (Anexo 1) ao inoculante em um béquer de 500 mL;
- b) Adicionar esta pasta às sementes, misturando-as em betoneira ou tambor com eixo excêntrico, até que apresentem uma camada de revestimento uniforme do inoculante envolvendo-as;
- c) Espalhar as sementes e deixá-las secando em local sombreado, fresco e arejado; e,
- d) Semear imediatamente em vasos ou no campo.

2.2. Inoculação Simples – Inoculante líquido

- a) Verificar a quantidade de calda (inoculante + água)/50 kg de semente, de acordo com as recomendações do fabricante;
- b) Misturar a calda com as sementes utilizando betoneira ou tambor com eixo excêntrico;
- c) Espalhar as sementes e deixá-las secando em local sombreado, fresco e arejado; e,
- d) Semear em vasos ou no campo.

2.3. Peletização de sementes

- a) Misturar o adesivo com o inoculante, respeitando as proporções em função da quantidade de semente a ser inoculada (Tabela 12);

- b) Acrescentar a mistura (adesivo + inoculante) às sementes e revolver com uma espátula, até que todas as sementes do lote estejam umedecidas;
- c) Acrescentar a substância veículo em pó (calcário ou fosfato de rocha);
- d) Aguardar entre 12 e 24 h, à temperatura ambiente, na sombra, para firmar o *pellet* (camada); e,
- e) Semear em vasos ou no campo.

Tabela 12. Quantidades de material utilizado em função do tamanho das sementes de leguminosas a serem peletizadas (FARIA et al., 1984 citado por DE-POLLI, 1985).

Leguminosa	Materiais utilizados na inoculação e no revestimento de sementes			
	Goma arábica 40 % ou goma caseira 7 % (mL)	Inoculante (g)	Semente (kg)	Calcário ou calcário + micronutrientes (1:1) (kg)
Sementes grandes: soja, feijão, fava, caupi, amendoim, guandu, leucena, ervilha, etc.	500	100	25	5
Sementes médias: calopogônio, siratro, soja perene, centrosema, etc.	500	100	10	8
Sementes pequenas: estilosantes, lotononis, desmodium, etc.	500	100	5	10

CAPÍTULO XII

RESPIRAÇÃO MICROBIANA

*Jair Alves Dionísio
Ida Chapaval Pimentel
Diana Signor*

A respiração microbiana (absorção de O_2 e/ou liberação de CO_2), é resultante da atividade exclusiva das bactérias, fungos, algas e protozoários do solo e incluem as trocas gasosas provenientes dos metabolismos aeróbio e anaeróbio (ANDERSON, 1982). O procedimento é realizado em laboratório, sob temperatura e umidade controladas. Já o termo respiração do solo resulta de toda atividade metabólica dos organismos do solo (micro e macro-organismos e raízes de plantas). O método de estudo utiliza a inserção de câmaras (respirômetros) na superfície do solo para quantificar a liberação de CO_2 .

A respiração microbiana corresponde à oxidação da matéria orgânica por organismos do solo que, portanto, utilizam o O_2 comoceptor final de elétrons, até CO_2 (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Assim, essa microbiota é a principal responsável pela decomposição dos resíduos orgânicos, pela ciclagem de nutrientes e pelo fluxo de energia no interior do solo, exercendo influência tanto na transformação da matéria orgânica, quanto na estocagem do carbono e nutrientes minerais, com consequente liberação de CO_2 para a atmosfera (JENKINSON; LADD, 1981).

Para se estimar as respirações – microbiana ou do solo – diversos métodos podem ser utilizados, baseando-se no consumo de O_2 ou na liberação de CO_2 . Para o consumo de O_2 , utiliza-se a cromatografia gasosa ou o eletrorespirômetro. Para a liberação de CO_2 , utiliza-se a titulação (quando este gás é capturado por NaOH ou KOH), condutividade elétrica, cromatografia gasosa, espectroscopia de infravermelho (IRGA) ou por ^{14}C , neste caso quando se deseja monitorar compostos orgânicos específicos.

A vantagem de se medir o CO_2 ao invés do O_2 está no fato deste refletir a atividade de micro-organismos aeróbios e anaeróbios (RODRIGUES; DE-POLLI, 2000), pois no solo, em ambiente aeróbio, pode haver sítios de anaerobiose.

Segundo Grisi (1995), o estudo da respiração do solo ou da respiração microbiana pode ser realizado em dois sistemas:

- 1) Estático: com a utilização de câmaras de incubação, sem aeração; e,
- 2) Dinâmico: com aeração constante em câmara de medição.

A respiração microbiana do solo – um dos mais antigos parâmetros para quantificar a atividade microbiana (ALEF, 1995) – também é conhecida como respiração basal (RBS), ou seja, aquela atividade microbiana que o solo apresenta em função do seu próprio teor de matéria orgânica. Além disso, é possível avaliar, no solo, a respiração induzida (RIS) por um substrato, na qual se adiciona uma fonte específica de substrato orgânico, como a glicose, por exemplo.

A atividade dos micro-organismos no solo pode ser estimada em termos metabólicos, por indicadores como CO_2 evoluído, O_2 absorvido, degradação de substratos, transformações de nutrientes e formação de metabólitos (WAID, 1984). De acordo com Moreira e Siqueira (2006), a respiração microbiana do solo está diretamente relacionada à decomposição da matéria orgânica no solo e à mineralização do húmus, sendo capaz de fornecer uma indicação aproximada do metabolismo total do solo. Além disso, é conhecida como a forma mais precisa na determinação da atividade microbiana, refletindo diretamente a atividade de micro-organismos heterotróficos do solo, os quais são importantes no processo de ciclagem de nutrientes, o que afeta diretamente a fertilidade e a qualidade do ambiente (ANDRÉA; PETTINELLI, 2000).

A velocidade de decomposição do resíduo orgânico no solo é determinada principalmente pelas características intrínsecas desse material, tais como: relação C/N; teor de carboidrato e lignina; grau de agregação; características do solo (pH, teor de nutriente e umidade, etc.) e do ambiente (temperatura e precipitação), ambos diretamente proporcionais à atividade microbiana no solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Os micro-organismos são os principais transformadores da matéria orgânica, realizam a decomposição de resíduos orgânicos e utilizam os elementos carbono e nitrogênio na proporção de 30/1, eliminando dois terços do carbono para a atmosfera na forma de CO_2 e imobilizando, no seu protoplasma, um terço com relação C/N 10/1 (SIQUEIRA, 1993).

Quando a relação C/N do material orgânico em decomposição for baixa (inferior a 30/1), como em leguminosas até o período da floração, ocorre rápida decomposição com liberação do NH_4^+ . Em caso de materiais com relação C/N alta (superior

a 30/1), poderá ocorrer imobilização temporária do N mineral pelos micro-organismos do solo, o que pode induzir a uma deficiência temporária de N para as plantas.

A estimativa das respirações, microbiana ou do solo, por meio da liberação de CO₂, é uma das mais eficientes ferramentas para se avaliar a recuperação de áreas degradadas, pelo baixo custo, eficiência e indicar mudanças rápidas (PASSIANTO et al., 2001).

Catellan e Vidor (1990b), trabalhando com diferentes sistemas de culturas, entre eles siratro, campo nativo e solo descoberto, encontraram os seguintes valores de respiração microbiana, respectivamente: 92,3; 207,0 e 57,8 mg C-CO₂ kg⁻¹ de solo, média de 12 coletas, na camada de 0 a 5 cm, durante dez dias de incubação. Os resultados permitem concluir que os sistemas com cobertura vegetal e efeito rizosférico tendem a apresentar maiores valores de respiração basal, se comparados com solos sem cobertura vegetal.

PROTOCOLO X

RESPIRAÇÃO BASAL DO SOLO EM SISTEMA ESTÁTICO, MÉTODO DE ALEF (1995)

1. Material

- a) Solo úmido coletado da camada superficial, obtido conforme o Capítulo II (p. 14);
- b) Vidraria: bureta automática de 10,0 mL, frascos de vidro escuros de 1,0 L com tampa, tubos de ensaio de 15,0 mL e Erlenmeyer de 125,0 mL;
- c) Equipamentos: estufa de incubação, balança de precisão centesimal, geladeira e agitador magnético;
- d) Soluções: fenolftaleína (0,1 %), HCl 0,5 N, BaCl₂ (50 %) e NaOH 0,5N;
- e) Outros: micropipetas com ponteiros de 1,0 mL e 10,0 mL, trado calor, peneiras número 10 (abertura de 2,00 mm) e número 20 (abertura de 0,85 mm), luvas de proteção (nitrílica descartável), pera insufladora, balde plástico de 5,0 L ou 8,0 L, espátula, substratos orgânicos: aveia, milho, soja, alfafa, húmus, serragem, celulose, esterco bovino; e,
- f) Alternativos: pipetas de 1,0 mL e 10,0 mL.

2. Metodologia

2.1. Respiração basal do solo (RBS)

- a) Pesar 10,00 g de solo úmido para determinar a massa de solo seco (item 3);
- b) Determinar a capacidade de retenção de água (CRA) e corrigir a umidade para 60,0 % da CRA, com água destilada (Anexo 3);
- c) Pesar 100,00 g de solo úmido, previamente tamizado, em peneira número 10 (abertura de 2,00 mm), em triplicata, e transferir para um frasco de vidro com tampa hermética;
- d) Colocar dentro do frasco de vidro um tubo de ensaio contendo 15,0 mL de NaOH 0,5 N padronizado (Anexos 1 e 4) para capturar o CO₂ produzido e outro tubo de ensaio contendo 10,0 mL de água destilada para manter a umidade do ambiente;
- e) Para cada dez frascos de vidro a serem incubados, realizar uma prova em branco, que corresponde a um frasco contendo apenas um tubo de ensaio com 15 mL de NaOH 0,5 N padronizado (Anexos 1 e 4) e outro contendo 10,0 mL de água destilada;

- f) Fechar hermeticamente os frascos de vidro e incubá-los em estufa a 25 °C por uma semana (168 h);
- g) Após o período de incubação, retirar dos frascos de vidro os tubos de ensaio contendo NaOH e transferir a solução para um Erlenmeyer de 125,0 mL, adicionar 1,0 mL de BaCl₂ (50 %) (Anexo 1) e duas gotas de fenolftaleína (Anexo 1); e,
- h) Após a padronização (Anexo 4), titular o excesso de NaOH com HCl 0,5 N (Anexo 1).

2.2. Respiração induzida pelo substrato (RIS)

Para determinar a RIS, o procedimento é o mesmo utilizado para a RBS, porém, adicionam-se ao solo, individualmente, substratos orgânicos em proporções conhecidas e homogeneiza-se com uma espátula. Os substratos são previamente secados em estufa a 60 °C, moídos e tamisados em peneira número 20 (abertura de 0,85 mm).

2.3. Sugestões de tratamentos

- a) Solo Testemunha (ST) = RB;
- b) Solo Testemunha + 1,0 % de palha de aveia (ST + PAV) = RIS;
- c) Solo Testemunha + 1,0 % de palha de milho (ST + PMI) = RIS;
- d) Solo Testemunha + 1,0 % de palha de alfafa (ST + PAL) = RIS;
- e) Solo Testemunha + 1,0 % de palha de soja (ST + PSO) = RIS;
- f) Solo Testemunha + 1,0 % de pó de serragem (ST + PSE) = RIS;
- g) Solo Testemunha + 1,0 % de celulose (ST + CE) = RIS;
- h) Solo Testemunha + 1,0 % de esterco bovino (ST + EB) = RIS; e,
- i) Solo Testemunha + 1,0 % de húmus (ST + HU) = RIS.

3. Cálculo

1. Calcular a respiração basal do solo (RBS) de acordo com Stotzky (1965):

$$\text{RBS ou RIS} \rightarrow \text{C-CO}_2 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1} = \{[(b-a) \times N \times E \times 1.000]/g^*\}/h$$

*Obtido após a secagem do solo úmido em estufa (105 °C) até massa constante.

Onde:

b: Volume de HCl gasto na prova em branco;

a: Volume de HCl gasto na amostra;

E: Equivalente do carbono;

N: Normalidade do HCl;

g: massa de solo seco; e,

h: horas de incubação.

4. Resultados

Tabela 13. Respiração microbiana do solo ($\text{mg C-CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) acumulada em função da adição de resíduos orgânicos.

Tratamento	Repetições				Média
	I	II	III	IV	
1. Solo testemunha (ST)					
2. ST + palha de aveia					
3. ST + palha de milho					
4. ST + palha de alfafa					
5. ST + palha de soja					
6. ST + pó de serragem					
7. ST + celulose					
8. ST + esterco bovino					
9. ST + húmus de minhoca					

CAPÍTULO XIII

BIOMASSA MICROBIANA

*Jair Alves Dionísio
Ida Chapaval Pimentel
Diana Signor*

A biomassa microbiana do solo (BMS), também conhecida como carbono da biomassa microbiana (C-BMS), é definida como a parte viva da matéria orgânica do solo e inclui bactérias, fungos, actinobactérias, algas e microfauna, excluindo-se as raízes e os animais maiores que $5 \times 10 \mu\text{m}^3$, sendo considerada o compartimento central do ciclo do carbono (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Esse reservatório contém, em média, de 2,0 a 5,0 % do C orgânico do solo (JENKINSON; LADD, 1981) e de 1,0 a 5,0 % do N total do solo (SMITH; PAUL, 1990).

O estudo do C-BMS foi apresentado inicialmente por Jenkinson e Powlson (1976) e tem crescido nos últimos anos. De acordo com Siqueira e Franco (1988), a sua importância se justifica por três aspectos:

- 1) É formada por células vegetativas vivas, capazes de promover mudanças importantes no solo;
- 2) Devido à grande quantidade e ao fato de ser o maior componente lábil da matéria orgânica do solo, torna-se um importante reservatório de nutrientes; e,
- 3) Representa um indicador de grande sensibilidade para avaliar mudanças no solo.

Dessa forma, o C-BMS pode ser utilizado como indicador de qualidade do solo, pois é grandemente influenciado pelo manejo, considerando que qualquer estresse no sistema afetará a densidade, a diversidade e a atividade das populações microbianas (PANKHURST et al., 1995). Assim, o monitoramento dos níveis do C-BMS é uma medida adequada para se determinar se um conjunto de práticas é sustentável (TÓTOLOA; CHAER, 2002).

Conforme Rodrigues (1997), os valores do C-BMS indicam o potencial de reserva de carbono no solo, que participa do processo de humificação. Portanto,

permite aferir o acúmulo ou a perda de carbono em função de determinado manejo: quanto maior a biomassa microbiana, maior será a reserva de carbono no solo, o que expressa menor potencial de decomposição da matéria orgânica.

O interesse em estimar a biomassa microbiana tem sido crescente, principalmente, pelo fato de que por meio dela podem-se avaliar modificações no solo muito antes de ser possível detectar alterações físico-químicas (POWLSON, 1987). Além disso, mudanças na biomassa microbiana podem indicar os efeitos dos xenobióticos no solo (ANDRÉA; PETTINELLI-JÚNIOR, 2000).

A quantidade média de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K) e cálcio (Ca) armazenada nas células vegetativas dos micro-organismos alcançam valores de 108, 83, 70 e 11 kg ha⁻¹, respectivamente (ANDERSON; DOMSCH, 1980). A liberação do N proveniente das células microbianas mortas por secamento/reumidamento do solo é cinco vezes mais rápida do que a liberação provida da matéria orgânica do solo (ANDERSON; DOMSCH, 1980). Considerando que a BMS é um reservatório de nutrientes, nesta poderão ser determinados: nitrogênio (N-BMS), fósforo (P-BMS), potássio (K-BMS), entre outros.

As populações microbianas contribuem de maneira diferenciada para a formação do C-BMS. Conforme Coleman (1994), os fungos, as bactérias e a microfauna podem atingir, respectivamente, os seguintes valores: de 700 a 2.700 kg ha⁻¹; de 500 a 750 kg ha⁻¹ e de 25 a 30 kg ha⁻¹ de C-BMS. Apesar de apresentarem maior densidade no solo, as bactérias têm contribuição menor, devido ao seu tamanho reduzido.

O C-BMS pode ser estimado de forma direta por microscopia dos componentes celulares (bactérias e fungos). De forma indireta, pode ser estimada pelos seguintes métodos:

- Fumigação-Incubação (FI) (JENKINSON; POWLSON, 1976);
- Respiração Induzida pelo Substrato (RIS) (ANDERSON; DOMSCH, 1978);
- Fumigação-Extração (FE) (VANCE et al., 1987); e,
- Irradiação-Extração (IE) (ISLAM; WEIL, 1998).

A FI e a FE são as mais utilizadas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Mas, deve-se destacar que ambas utilizam o clorofórmio e a IE, o cromo, que são reagentes químicos com potencial carcinogênico (BRASIL, 2005).

Utilizando-se o método de FI, Catellan e Vidor (1990b) observaram na camada de 0 a 5 cm, média de doze coletas mensais, valores de C-BMS/100 g de solo 32,0; 40,7; 61,5 mg, respectivamente, para pangola, siratro e campo nativo. Rodrigues et al. (1995), trabalhando com três classes de solo: Podzólico Vermelho-Amarelo, Gley pouco húmico e Planossolo arenoso, com amostragens em duas profundidades (0 a 5 cm e 5 a 20 cm) observaram valores de C-BMS de 8 a 229 $\mu\text{g g}^{-1}$ de solo e de 63 a 269 $\mu\text{g g}^{-1}$ de solo, respectivamente, pelos métodos FI e FE.

A partir dos valores de respiração microbiana do solo, biomassa microbiana e carbono orgânico total do solo (COT) é possível obter os seguintes índices ecológicos:

- 1) Quociente metabólico ($q\text{CO}_2$), que representa a quantidade de C- CO_2 evoluído por unidade de C microbiano (g h^{-1} de C- $\text{CO}_2/\text{mg g}^{-1}$ de C-biomassa microbiana do solo); e,
- 2) Quociente microbiano ($q\text{MIC}$), que é a relação C-BMS/COT.

O $q\text{CO}_2$ prediz que a biomassa microbiana se torna mais eficiente a partir do momento que menos carbono é perdido na forma de CO_2 pela respiração, possibilitando assim, maior incorporação de carbono aos tecidos microbianos.

Segundo Tótola e Chaer (2002), valores mais elevados de $q\text{CO}_2$ indicam maior consumo de carbono prontamente mineralizável, elevando as perdas de CO_2 , o que não é desejado.

PROTOCOLO XI

MÉTODO DE RESPIRAÇÃO INDUZIDA (RIS) PELO SUBSTRATO (ANDERSON; DOMSCH, 1978 DESCRITO POR HOPPER, 2006)

1. Material

- a) Solo úmido coletado da camada superficial, conforme o Capítulo II, glicose anidra;
- b) Vidraria: pipetas de 10 mL, bureta automática de 10,0 mL, frascos de vidro escuros (1.000 mL) com tampa, tubos de ensaio de 15,0 mL, Erlenmeyer de 125 mL e dessecador;
- c) Equipamentos: estufa de incubação, balança de precisão centesimal, geladeira e agitador magnético;
- d) Outros: peneira de número 10 (abertura de 2,00 mm), luva de proteção e papel toalha;
- e) Soluções: BaCl_2 50 %, fenolftaleína (0,1 %), NaOH 0,1 N e HCl 0,1 N; e,
- f) Alternativos: pipetas de 1,0 mL, algodão hidrofóbico e pera insufladora.

2. Metodologia

Esse método, proposto por Anderson e Domsch (1978), é baseado no aumento inicial da taxa de respiração da população microbiana, até o máximo, quando uma fonte de carbono, prontamente decomponível, é adicionada em excesso ao solo.

- a) Pesar 10,0 g de solo úmido, em duplicata, para determinar a massa de solo seco (item 3);
- b) Determinar a capacidade de retenção de água (CRA) e a partir desse valor calcular a quantidade de água necessária para atingir 60 % da CRA (Anexo 3);
- c) Pesar 20,0 g de solo seco e transferi-lo para frascos de vidro (250 mL) com, no mínimo, três repetições;
- d) Acrescentar 60 mg de glicose anidra diluída em água destilada, calculada de acordo com o item “b”;

- e) Homogeneizar o solo e a glicose com um bastão de vidro, fechar hermeticamente e pré-incubar em estufa a 22 °C por 2 h;
- f) Colocar no frasco de vidro um tubo de ensaio contendo 10 mL de NaOH 0,1N (Anexo 1) e incubar em estufa a 22 °C por 4 h;
- g) Realizar a prova em branco, utilizando um frasco de vidro de 250 mL, contendo apenas um tubo de ensaio com 10,0 mL de NaOH 0,1N;
- h) Transferir o NaOH 0,1 N do tubo de ensaio para um Erlenmeyer de 125 mL;
- i) Adicionar 0,5 mL de BaCl₂ 50,0 % (Anexo 1) e duas gotas de fenolftaleína 0,1 % (Anexo 1); e,
- j) Titular com HCl 0,025 N (Anexo 1) e anotar a quantidade de ácido consumida.

3. Cálculo

Calcular a biomassa microbiana do solo conforme Anderson e Domsch (1978) descrito por Hoper (2006).

$$\text{BMS } (\mu\text{g C g}^{-1}) = 30(b-a) \times \left\{ \frac{K \times 22 \times 1.000}{(1,8295 \times \text{PA} \times 4)} \right\}$$

Onde:

BMS: carbono da biomassa microbiana ($\mu\text{g C g}^{-1}$);

30: constante ($\text{mg C mic h mL CO}_2^{-1}$);

b: média do volume (mL) de HCl gasto para titular as provas em branco;

a: mL HCl gastos para titular as amostras;

K: concentração da solução de HCl;

22: fator de conversão (1,0 mL HCl 1,0 M corresponde a 22,0 mg de CO₂);

1.000: fator de conversão de kg de solo para g de solo;

1,8295: densidade do CO₂ a 22 °C;

PA: massa da amostra (g de solo seco); e,

4: fator de conversão para transformação de 4 para 1 h.

4. Resultados

Tabela 14. Carbono da biomassa microbiana do solo ($\mu\text{g C g}^{-1}$) em diferentes solos.

Solo	Repetições				Média
	I	II	III	IV	
A					
B					
C					
D					
E					

Tabela 15. Quociente metabólico (RBS C-BMS⁻¹) em diferentes solos.

Solo	Repetições				Média
	I	II	III	IV	
A					
B					
C					
D					
E					

Tabela 16. Quociente microbiano do solo (C-BMS COT^{-1*}) em diferentes solos.

Solo	Repetições				Média
	I	II	III	IV	
A					
B					
C					
D					
E					

*COT: carbono orgânico total do solo.

CAPÍTULO XIV

DECOMPOSIÇÃO DE RESÍDUOS ORGÂNICOS

*Diana Signor
Jair Alves Dionísio*

O termo decomposição é utilizado para descrever um grande número de processos inter-relacionados nos quais a matéria orgânica é desintegrada em partículas menores e formas solúveis de nutrientes, que são absorvidos pelas plantas, formando o húmus.

O estudo da produção e decomposição da serapilheira, com a consequente transferência de nutrientes para o ambiente, é essencial para caracterizar os padrões de ciclagem, pois representa a principal via de retorno desses e da matéria orgânica à superfície do solo (AIDAR et al., 2003).

Resíduos vegetais sob a superfície do solo ou incorporados a ele, em condições aeróbias, sofrem rápido ataque de micro-organismos heterotróficos em busca de carbono, energia e nutrientes, sendo os fungos e as bactérias os seres mais ativos na decomposição da matéria orgânica do solo.

A decomposição, usualmente, não é contínua, apresentando fases ativas e períodos de inibição, intercalados. Assim, os nutrientes minerais são liberados pela desintegração física dos tecidos e aumento da área superficial pela ação da fauna edáfica, para:

- Posterior ação por bactérias e fungos;
- Decomposição seletiva de materiais (açúcares, celulose e lignina);
- Transformação dos resíduos vegetais em material húmico;
- Mistura da matéria orgânica decomposta à camada superior do solo; e,
- Formação de complexos agregados entre a matéria orgânica e a fração mineral do solo.

A maioria dos fatores ambientais que interferem na decomposição de resíduos orgânicos está relacionada à atividade dos micro-organismos decompositores. São eles:

- Temperatura;
- Umidade;
- Teor de matéria orgânica do solo;
- Localização e quantidade de material adicionado;
- pH;
- Concentração de O₂ livre no solo; e,
- Presença de adubos verdes, fertilizantes, arações, gradagens, manejo do solo e uso de herbicidas.

Também exercem influência na decomposição do resíduo, as características intrínsecas do material, tais como (CERETTA et al., 2002):

- Carbono/nitrogênio (C/N);
- Carbono/fósforo (C/P);
- Nitrogênio/fósforo;
- Lignina; e,
- Polifenóis.

O grau de maturação das plantas também regula a permanência dos resíduos no solo, já que o aumento na relação C/N dificulta a sua decomposição.

A estimativa do tempo necessário para a quase completa decomposição dos resíduos vegetais é importante. A permanência da palha na superfície do solo é de fundamental importância para a manutenção do sistema plantio direto. Isso reforça a preocupação de produzir resíduos vegetais de decomposição mais lenta, para manter o resíduo sobre o solo por maior período de tempo (KLIEMANN et al., 2006). Deve-se, pois, planejar rotações de culturas mais adequadas e compatíveis com os sistemas de manejo conservacionistas do solo, ou seja, planejar e adotar, de acordo com as possibilidades, rotações de culturas cujos resíduos persistam o maior tempo possível (BERTOL et al., 2004).

Kliemann et al. (2006) estabeleceram a hierarquia de decomposição para algumas espécies vegetais em ordem decrescente de decomposição: gramíneas – sorgo (80 %) > capim Mombaça (64 %) > milheto (58 %) > braquiária em cultivo solteiro (56 %) e em cultivo consorciado (48 %); e leguminosas – estilosantes (72 %) > guandu (65 %).

A velocidade de liberação de nutrientes dos resíduos culturais durante o processo de decomposição depende da localização e da forma em que se encontram no tecido vegetal.

Em geral, os estudos de decomposição são feitos em laboratório pela incubação do material vegetal com solo ou em condições de campo. A taxa de decomposição é estimada pela perda de massa, de carbono na forma de CO_2 , ou com o uso de carbono e nitrogênio marcados.

Em sistemas terrestres, a decomposição é estudada pelo método de *litter bags* (sacolas de decomposição). A técnica é a mais utilizada atualmente e consiste em acondicionar massa vegetal conhecida, ou quimicamente conhecida, em recipientes fechados. Um grande número de sacolas é colocado no campo e, temporariamente, um grupo é retirado para analisar a perda de massa ou a mudança na composição química do *litter*. Todavia, esse método pode induzir a vários erros, tais como, excluir certos organismos, causar modificação no microclima dentro das bolsas, diferindo do ambiente natural, afetando as taxas de decomposição (COLLEMAN; CROSSLEY, 1996). O método é ainda suscetível a grandes erros, devido à perda de fragmentos e à entrada de materiais exógenos na sacola (EDWARDS, 1977).

Scheer (2008) estudando a decomposição e a liberação de nutrientes da serapilheira foliar em um trecho de floresta ombrófila densa aluvial em regeneração, em Guaraqueçaba – PR, pelo método de *litter bags*, estimou tempo médio de um ano, para que pelo menos a metade do material foliar depositado no solo da capoeira fosse decomposto. O autor ressalta que o tempo foi inferior ao obtido para florestas tropicais, mas similar a outros estudos realizados na Floresta Atlântica.

PROTOCOLO XII

DETERMINAÇÃO DA TAXA DE DECOMPOSIÇÃO DE RESÍDUOS ORGÂNICOS

1. Material

- a) Equipamentos: estufa e balança de precisão centesimal; e,
- b) Outros: serapilheira de diferentes áreas, sacola plástica para coleta, sacolas de náilon (malhas de 0,2; 0,5; 1,0 e 2,0 mm), pá de corte, béquer de 200 mL, pinça, pincel fino e luva de proteção (nitrílica descartável).

2. Metodologia

- a) Coletar, em sacola plástica, aproximadamente 500 g serapilheira de diferentes áreas;
- b) Determinar a umidade da serapilheira em estufa a 65 °C por 48 h;
- c) Calcular fator de correção para umidade do item anterior (massa úmida/massa seca⁻¹);
- d) Colocar 10 g de serapilheira de cada amostra em sacolas de náilon (15 x 10 cm) com diferentes espessuras (malhas de 0,2; 0,5; 1,0 e 2,0 mm), para evidenciar a ação dos diferentes componentes da fauna edáfica em função do diâmetro do corpo dos animais;
- e) Fazer, no mínimo, cinco repetições para cada amostra analisada;
- f) Identificar devidamente as sacolas de náilon e distribuí-las na superfície do solo;
- g) Após períodos variáveis de tempo (30, 60 e 90 dias), recolher as sacolas de náilon, tomando cuidado para não danificar o material;
- h) Levar as sacolas para laboratório, retirar cuidadosamente, com um pincel fino, o solo que ficou aderido às partículas da serapilheira de diferentes áreas; e,
- i) Colocar a serapilheira em béquer de 200 mL e secar em estufa a 65 °C por 48 h e pesar.

3. Cálculo

- a) Fitomassa remanescente (%) = (massa seca final/massa seca inicial) x 100; e,

- b) Calcular a constante de decomposição K ao longo do período de avaliação (OLSON, 1963):

$$W_t = W_0 e^{-kt}$$

Onde:

W_t: fitomassa remanescente (%);

W₀: massa inicial do material (utilizado sempre como 100 %);

e: exponencial;

k: taxa de decomposição; e,

t: tempo em que o material ficou no campo (dias).

4. Resultados

Tabela 17. Porcentagem de biomassa residual com diversas coberturas vegetais em função da malha das sacolas de decomposição (*litter bags*) e do tempo.

Tratamento (mm)	Repetições (%)					Média
	I	II	III	IV	V	
1. Malha 0,2						
2. Malha 0,5						
3. Malha 1,0						
4. Malha 2,0						

Tabela 18. Constante de decomposição “K” com diversas coberturas vegetais em função da malha das sacolas de decomposição (*litter bags*) e do tempo.

Tratamento (mm)	Repetições (%)					Média
	I	II	III	IV	V	
1. Malha 0,2						
2. Malha 0,5						
3. Malha 1,0						
4. Malha 2,0						

CAPÍTULO XV

PROTOZOÁRIOS

Jair Alves Dionísio
Ana Luiza Mattana
Diana Signor

Os protozoários representam uma das formas mais primitivas de vida que ocorre no solo, são protistas superiores, unicelulares, sem parede celular, aeróbios, assimétricos e possuem capacidade de regeneração, cujo tamanho pode variar de alguns micrômetros até um ou mais centímetros (RUPPERT et al., 2005). Reproduzem-se predominantemente de forma assexuada, por fissão binária e, sexualmente, porém raramente, pela união dos gametas (BRANDÃO, 1992).

O ciclo de vida dos protozoários é dividido em duas fases: ativa (trofozoíto) e de repouso (dormência ou estágio de cisto). A fase ativa ocorre quando o protozoário encontra condições nutricionais e ambientais favoráveis à sua alimentação e a reprodução, enquanto a fase cística ocorre em condições adversas à sua sobrevivência, na qual poderá persistir por vários anos (RUPPERT et al., 2005).

De acordo a estrutura de locomoção, os protozoários são classificados em:

- Mastigofora ou flagelados: locomoção por flagelos (*Bodo*, *Cercobodo* e *Tetramitus*);
- Ciliata: locomoção por cílios (*Colpoda*, *Balantiophorus* e *Uroleptus*); e,
- Sarcodina (rizópodos ou amebas): locomoção por pseudopodos (*Biomyxa*, *Naegleria* e *Euglypha*).

As amebas podem, ainda, ser classificadas de acordo com o envoltório celular (com ou sem tecas) que, quando presente, pode ser orgânico, silicoso, orgânico-silicoso ou composto de materiais estranhos incrustados em uma matriz cimenteira (RUPPERT et al., 2005).

Dos grupos de protozoários que habitam os solos, os maiores são os ciliados, que podem variar de 10 a 80 μm de comprimento, conter milhares de cílios em cada célula e consumir os outros tipos de protozoários (USDA, 1999). No entanto,

os flagelados são os menores protozoários do solo, com comprimento longitudinal que varia de 5 a 20 μm , contendo geralmente de 1 a 4 flagelos (BRANDÃO, 1992).

De acordo com a forma de obtenção de nutrientes, os protozoários podem ser classificados como quimiorganotróficos, que necessitam de substâncias orgânicas pré-formadas no ambiente e fotolitotróficos, que são capazes de sintetizar compostos orgânicos pela fotossíntese, como *Euglena gracilis*, por exemplo. Os quimiorganotróficos dividem-se ainda em: saprófitas, que obtêm seus nutrientes por absorção direta do meio onde se encontram e holozoicos, que ingerem micro-organismos (principalmente bactérias, mas podem consumir matéria orgânica solúvel, outros protozoários, algas e alguns fungos), por fagocitose, sendo o alimento digerido no vacúolo e a fração não digerida eliminada no ambiente.

Os protozoários Ciliata são principalmente predadores, utilizando-se de algas e bactérias; já os Sarcodina são primariamente saprófitos, mas incluem formas predatórias; e os Mastigofora incluem ambas as formas, saprófitos e predadores (JOPKIEWICZ; SZTRANTOVICZ, 1993). Porém, o grupo das Sarcodina denominado “*vampirellides*” se alimenta do fungo fitopatógeno *Gaemannomyces graminis* (USDA, 1999).

Os protozoários halozoicos apresentam, em suas células, concentração de nitrogênio inferior à das bactérias ingeridas, pois a relação C/N desses organismos pode variar de 10:1, ou mais, e nas bactérias de 3/1 a 10/1. Bactérias consumidas por protozoários contêm muito mais N do que a quantidade requerida de carbono. Assim, o excesso de N gerado no predador é liberado na forma de amônio, geralmente próximo ao sistema radicular das plantas (USDA, 1999). Representam importante fonte alimentar para outros organismos – rotíferos e anelídeos (CUTOLO; ROCHA, 2000) e, por outro lado, ajudam a suprimir doenças dos vegetais, por competirem com os fitopatógenos ou por alimentarem-se deles (USDA, 1999).

Solos de áreas florestais, com pH normalmente ácido, onde há predominância de fungos, geralmente tem mais amebas testáceas e ciliados do que os outros solos. Em solos dominados por bactérias, há predominância de flagelados e amebas não testáceas. A densidade populacional de protozoários no solo está associada à reunião de condições favoráveis à sua sobrevivência, quer seja saprófita ou predadora (USDA, 1999).

A população de protozoários varia em função da fertilidade do solo, de 10^4 g^{-1} a 10^5 g^{-1} de solo (BRANDÃO, 1992), com biomassa de 15 a 150 kg ha^{-1} (SIQUEIRA, 1988), e localiza-se nos espaços interagregados (JASTROW; MILLER,

1991). Geralmente, em solos com altos teores de argila, predominam os protozoários menores: flagelados e amebas não testáceas, porém em solos com textura média a arenosa há predomínio de flagelados maiores, como amebas e ciliatas (USDA, 1999).

Os protozoários são os maiores controladores da densidade populacional de bactérias introduzidas no solo, tais como *Rhizobium* e *Bacillus thuringiensis* (CASIDA JUNIOR, 1989). Os microporos do solo, com diâmetro entre 2 e 6 μm , são micro-habitat favoráveis às bactérias, pois servem de proteção contra a predação por protozoários. Heijnen e Van Venn (1991) demonstraram que a sobrevivência de rizóbio introduzido no solo aumentou com a adição da argila bentonita, devido ao aumento de microporos que servem de micro-habitat para essa bactéria.

PROTOCOLO XIII

MÉTODO CULTURAL PARA CONTAGEM DE PROTOZOÁRIOS DO SOLO, ADAPTADO DE SINGH (1946)

1. Material

- a) Solo úmido, coletado conforme o Capítulo II (p. 14);
- b) Vidrarias: Erlenmeyer de 250 mL, pipetas de 1 mL, tubos de ensaio de 15 mL com rosca, placas de Petri e alça de Drigalsky;
- c) Equipamentos: agitador mecânico, estufa de esterilização, estufa de incubação, capela de fluxo laminar, autoclave, peagâmetro, esterilizador infravermelho ou bico de Bunsen ou lamparina, microscópio ótico, gás butano e agitador de tubos;
- d) Soluções: solução salina (NaCl 0,85 %), safranina 0,5 % (Anexo 1) e meio de cultura ágar nutriente (Tabela 19); e,
- e) Outros: micropipetas com ponteiros de 0,1 mL, peneira de número 10 (abertura de 2,00 mm) e luva de proteção (nitrílica descartável).

Tabela 19. Meio de cultivo Ágar Nutriente.

Reagente	Quantidade (g L ⁻¹ ou mL L ⁻¹)
Caldo nutritivo*	1.000,0 mL
Ágar	15,0 g

Obs. Ajustar o pH para 7,2 com NaOH 1,0 N

Caldo nutritivo

Reagente	Quantidade (g L ⁻¹)
Extrato de carne	3,0
Peptona	10,0
Água destilada q.s.p.	1.000,0

2. Metodologia

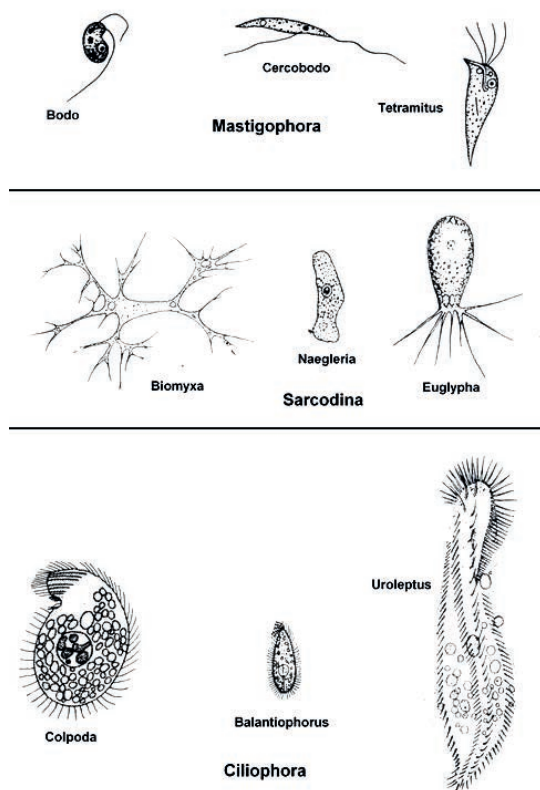
2.1. Cultivo bacteriano

- a) Utilizar bactéria digerível (*Aerobacter aerogenes*, *Azotobacter chroococcum*, *Escherichia coli* ou *Rhizobium phaseoli*);
- b) Cultivar a bactéria em tubo de ensaio, inclinado, contendo o meio ágar nutriente por, no mínimo, 72 h a 25 °C;
- c) Preparar placas de Petri com meio ágar nutriente;
- d) Acrescentar cinco anéis de vidro (10 x 20 mm), esterilizados, de forma equidistante, no meio de cultura;
- e) Suspende o cultivo bacteriano em solução salina esterilizada;
- f) Pipetar 0,1 mL da suspensão e inocular uma gota em cada anel; e,
- g) Incubar a 25 °C por, no mínimo, três dias.

2.2. Diluição e inoculação do solo

- a) Pesar 10,0 g de solo úmido, obtido conforme o Capítulo II (p. 14), previamente tamizado, em peneira número 10 (abertura de 2,00 mm) em duplicata, sendo uma parte destinada à contagem de protozoários e a outra para determinação da massa de solo seco (item 3);
- b) Transferir o solo para Erlenmeyer de 250 mL contendo 90 mL de solução salina esterilizada (diluição 1:10);
- c) Dispersar as células e cistos de protozoários do solo em agitador mecânico ($\cong 3 G$) durante 15 minutos;
- d) Com uma micropipeta, contendo ponteira esterilizada, transferir 1,0 mL da suspensão para um tubo de ensaio contendo 9,0 mL de solução salina esterilizada e agitar, no agitador de tubos ou manualmente, cinco vezes (diluição 1:100);
- e) Transferir, com outra ponteira esterilizada, 1,0 mL da solução anterior para outro tubo de ensaio contendo 9,0 mL de solução salina esterilizada e agitar cinco vezes (diluição 1:1.000);
- f) Repetir o item “e” para atingir a diluição 1:10.000. Repetir a operação para obter a diluição de 1:100.000;

- g) Inocular de cada diluição (10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}) uma gota ($\cong 0,05$ mL) no centro do anel, realizando-se quatro repetições/diluição;
- h) Incubar a 25°C por 14 dias;
- i) Realizar as contagens, com uma lupa, considerando-se como casos positivos os anéis que apresentam clareamento do cultivo bacteriano;
- j) Contar os casos positivos e obter os valores correspondentes na Tabela do Número Mais Provável²; e,
- k) Dos casos positivos, transferir com alça de platina uma porção do crescimento para uma lâmina de vidro, contendo água deionizada, homogeneizar e realizar a identificação das classes de protozoários por microscopia ótica, com auxílio das ilustrações (Figura 4).



Fonte: Alexander (1980).

Figura 4. Classes de protozoários do solo.

²Disponível em: www.funasa.gov.br/site/wp-content/files_mf/eng_analAgua.pdf

3. Cálculo

$$(\text{N}^\circ \text{ de protozoários}) \text{ g}^{-1} = \text{diluição} \times \text{n}^\circ \text{ código (NMP)}^* \times 10 \text{ g}^{-1*}$$

*Obtido após a secagem do solo úmido em estufa (105°C) até massa constante.

4. Resultados

Estimar a densidade de protozoários pelo método do Número Mais Provável (NMP) (Anexo 5) e completar a Tabela 20.

Tabela 20. Densidade populacional de protozoários g^{-1} em diferentes solos.

Solo	Classes*			Total
	Sarcodina	Mastigofora	Ciliata	
A				
B				
C				
D				
E				

CAPÍTULO XVI

NEMATOIDES

Arlei Maceda

Nematoides, Filo Nemata (=Nematoda) Cobb, 1919, são vermes de corpo cilíndrico, geralmente esguios e alongados, afinando-se de modo gradual ou abrupto nas extremidades anterior e posterior. Podem variar de tamanho, de acordo com o meio onde vivem. Nematoides de vida livre e fitoparasitos medem de 0,3 a 3,0 mm de comprimento, já os parasitas de animais são maiores, cerca de 15,0 cm, para *Ascaris lumbricoides* ou 8,0 m para *Placentonema gigantissima*, parasito da baleia de espermacete (FERRAZ, 2007).

A população de nematoides é a mais expressiva da fauna do solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006) e, segundo Jastrow e Miller (1991), localiza-se entre os micro e os macroagregados. É composta por diferentes grupos tróficos, que podem atingir valores de 10^6 m^{-2} a 10^7 m^{-2} e biomassa de 2 a 100 kg ha^{-1} (SIQUEIRA, 1988). Distinguem-se, pelo menos cinco grupos, pelo hábito alimentar (YEATES et al., 1993):

- Bacteriófagos;
- Fitófagos;
- Micófagos;
- Onívoros; e,
- Predadores.

Em solo de cerrado nativo, Huang (1996) observou que nematoides representaram, aproximadamente:

- Fitonematoides: 40 %;
- Onívoros: 30 %;
- Bacteriófagos: 20 %;
- Micófagos: 7 %; e,
- Predadores: 3 %.

Porém, os mais importantes no solo são os fitoparasitas e os bacteriófagos (MATTOS et al., 2006).

Os diferentes grupos tróficos são atraídos para a rizosfera das plantas devido à presença de bactérias e fungos que ali se agrupam, estimulados pela presença de exsudatos radiculares (MATTOS et al., 2006), caracterizando o aspecto dinâmico da comunidade de nematoides.

Nematoides bacteriófagos podem reduzir significativamente as populações de bactérias e incrementar a mineralização (COLEMAN et al., 1991), porém, alimentam-se indistintamente de bactérias benéficas, saprofíticas e patogênicas (CHANTANAO; JENSEN, 1969). Assim, podem interferir na nodulação de leguminosas induzida pelo rizóbio (KO et al., 1984) ou, ainda, alimentar-se de bacteroides, conforme constatado por (WESTCOTT; BARKER, 1976) na cultura de *Pisum sativum*.

De acordo com Nielsen (1961), uma população de nematoides de 10^6 m^{-2} pode consumir $800 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ de biomassa bacteriana. Ao se alimentarem dessa biomassa, com baixa relação C/N, contribuem para aumentar o N disponível, pois excretam volume significativo de N mineral no solo, afetando o crescimento das plantas (MATTOS et al., 2006). Os nematoides fitófagos são muito conhecidos pelos prejuízos que causam à agricultura, com efeito mais evidente em solos mais secos.

Os nematoides terrestres são, também, aquáticos pois requerem um pequeno filme de água em volta das partículas de solo na qual sobrevivem, movimentam-se e se reproduzem (FRECKMAN; BALDWIN, 1990). Dessa forma, vivem em quaisquer condições onde exista água, sendo sensíveis a fortes estresses hídricos. Chistopher e Womersley (1990) e Kung et al. (1990), ambos citados por Acevedo et al. (2005), afirmam que solos com baixo conteúdo de umidade inativam juvenis infectantes, estimulando processos de quiescência e anidrobiose, que causam diminuição de metabolismo chegando, às vezes, à morte, se a umidade do solo permanecer baixa por um longo período de tempo. Algumas espécies, no entanto, suportam ambientes com baixa umidade por meses ou anos, como o interior de sementes armazenadas. Temperaturas muito baixas ou excessivamente altas podem reduzir a atividade e até mesmo provocar a morte dos nematoides (FERRAZ, 2007).

Os nematoides também podem ser disseminadores de bactérias, fungos, actinobactérias e micoplasmas por transmissão de propágulos, internamente e externamente (FRECKMAN; BALDWIN, 1990).

A textura do solo influencia a distribuição dos nematoides. Geralmente, em solos orgânicos, de textura arenosa e franco-arenosa, a sobrevivência e o deslocamento desses organismos são maiores que em textura argilosa (AZEVEDO et al., 2005).

A distribuição horizontal dos nematoides no solo é afetada pela movimentação de animais, máquinas, implementos agrícolas e enxurradas, enquanto a distribuição vertical sofre efeitos dos fatores climáticos, profundidade de raízes e estágio de desenvolvimento das plantas (DIAS-ARIEIRA, 2003). O manejo da área também é um fator importante, pois segundo Sereia et al. (2007), a monocultura de soja em plantio convencional por oito anos exerceu efeito significativo sobre a população de *Rotylenchulus reniformis*. Por outro lado, em sistemas com maior diversificação de culturas (plantio direto e integração lavoura-pecuária), a população de nematoides foi significativamente semelhante ao que ocorreu na mata primária. A não detecção de *R. reniformis* em sistema de pastagem contínua reflete a resistência da braquiária, utilizada como pastagem, a esta espécie de nematoide.

Mattos et al. (2006) observaram predomínio de nematoides micófagos em sistemas perenes e de bacteriófagos em áreas sob cultivo anual. No cultivo convencional, a distribuição da população de bacteriófagos é mais homogênea, enquanto no cultivo mínimo, há concentração na região da rizosfera. Assim, destacaram-se entre outros grupos de animais e passaram a ser estudados como indicadores de impacto ambiental, podendo diferenciar diversos sistemas de uso do solo (MATTOS, 2002).

PROTOCOLO XIV

MÉTODO DE AVALIAÇÃO DA DENSIDADE DE NEMATOIDES NO SOLO

Há uma variação muito grande nos métodos de extração de nematoides de solos ou de tecidos/órgãos vegetais. O método flotação centrífuga em solução de sacarose é internacionalmente aceito e utilizado, pois é relativamente fácil e de rápida execução (JENKINS, 1964).

Para se estimar a população de nematoides no solo com mais precisão, aconselha-se fazer, no mínimo, três repetições do método por amostra.

AMOSTRAGEM E ACONDICIONAMENTO DE AMOSTRAS

Coletar o solo com os mesmos princípios da amostragem para fins de fertilidade, ou seja, amostras compostas, representativas e de áreas homogêneas, nas camadas de 0 a 30 cm, descartando-se a camada de 0 a 5 cm.

Acondicionar as amostras (aproximadamente 1 L) em sacos plásticos e identificá-las externamente. Coletar solos com a umidade próxima à capacidade de campo, evitando-se solos muito secos ou excessivamente encharcados. Durante o procedimento de coleta da amostra, não expô-la a altas temperaturas, caso seja necessário, mantê-la em caixa de isopor. Enviar o mais rapidamente possível ao laboratório, não sendo viável mantê-la em refrigerador a temperaturas de 4 a 8 °C. O ideal é ter uma amostra por hectare, entretanto, em grandes áreas, uma amostra pode representar até 20 hectares.

EXTRAÇÃO PELO MÉTODO FLOTAÇÃO CENTRÍFUGA EM SOLUÇÃO DE SACAROSE (JENKINS, 1964)

1. Material

- a) Amostra de solo;
- b) Equipamentos: centrífuga (com tubos para 100 mL), balança analítica, refrigerador e microscópio ótico;
- c) Soluções: sacarose com densidade (1,15 a 1,18), Dimetilsulfoxido – DMSO (20,0%);

- d) Vidrarias: bastão de vidro, béqueres de 100 mL, pipetas de 1 mL e 10 mL, tubos de ensaio graduados aos 4 mL; e,
- e) Outros: cubas, contador manual de células de múltiplas entradas, grades para tubos de ensaio, lâmina de Peters, lixeira para resíduos biológicos, luvas de proteção, peneiras de número 10 (abertura de 2,00 mm) e número 400 (abertura de 0,037 mm) e papel toalha.

2. Metodologia

2.1. Peneiramento

Fundamentação da fase: separar fisicamente os nematoides (tamanhos diferentes) dos componentes do solo, utilizando diferentes aberturas de peneiras.

- a) Misturar bem e, utilizando um béquer, tomar 100 cm³ (ou 100 mL) de solo (não é necessário compactá-lo);
- b) Transferir o solo para um recipiente de 2.000 a 3000 mL, acrescentar água (\pm 500 mL) e homogeneizar, de tal maneira a destorroá-lo totalmente; acrescentar mais água (\pm 1.000 mL) e aguardar 15 segundos para a sedimentação da argila;
- c) Tamisar o sobrenadante em peneira número 10 (abertura de 2,00 mm), sobreposta em recipiente de 2.000 a 3.000 mL;
- d) Tamisar a suspensão obtida no item “c” em peneira número 400 (abertura de 0,037 mm), com jatos fracos de água de torneira, concentrar o conteúdo em um dos lados da peneira, com batidas leves na lateral ou dedilhamento no fundo externo da peneira; e,
- e) Recolher o sobrenadante da peneira de número 400, com uma pisseta, em um béquer de 100 mL.

2.2. Centrifugação e leitura

Fundamentação da fase: separar os nematoides do solo (clarificando a suspensão) por diferença de gravidades específicas da água (1,0), dos nematoides (1,02 a 1,09), da solução de sacarose (1,15 a 1,18) e do solo (\cong 1,2). Algumas espécies de nematoides ou formas são mais densas e o método não apresenta recuperação alta.

- a) Transferir a suspensão para tubos de centrífuga de 100 mL e equilibrar as massas, em uma balança, com água (colocar no máximo 80 mL no tubo). Caso o volume obtido seja superior ao volume dos tubos, retorna-se à peneira número 400 e recoleta-se a suspensão;
- b) Centrifugar a suspensão a 1.750-1800 rpm por, no mínimo, 4 minutos;
- c) Passado o tempo, retirar os tubos e, cuidadosamente, descartar o sobrenadante;
- d) Limpar os bordos do tubo (com os dedos) para retirar possível acúmulo de impurezas e acrescentar a solução de sacarose (de 60 a 80 mL);
- e) Agitar com um bastão de vidro para ressuspender o sedimento. Ao mudar de amostra, limpar bem o bastão com papel toalha;
- f) Equilibrar as massas com a solução de sacarose e centrifugar a suspensão a 1.750-1.800 rpm, por 1 minuto;
- g) Verter o sobrenadante de cada tubo, individualmente, em peneira número 400;
- h) Deixar escorrer água de torneira sobre a peneira para retirar o excesso de sacarose (jatos fracos);
- i) Recolher o conteúdo da peneira em um béquer de 100 mL, com uma piseta (40 mL);
- j) Transferir o conteúdo para um tubo de ensaio graduado a 4 mL;
- k) Deixar repousar por, no mínimo, 1 h em refrigerador;
- l) Após esse período, retirar a água além dos 4 mL, com uma pipeta; e,
- m) Agitar a suspensão, retirar 1,0 mL e transferir para a lâmina de Peters, e então levar ao microscópio ótico para contagem e identificação (aumento de 100 vezes).

2.3. Procedimentos para preservação

- a) Após a extração dos nematoides, concentrá-los em água deionizada (verificar em esteromicroscópio a presença de nematoides);
- b) Tomar a suspensão extraída e despejá-la em uma peneira de número 400 ou 500, concentrando os nematoides na parte inferior dela;
- c) Com uma pisseta, adicionar a solução de DESS (Anexo 5) no lado da

CAPÍTULO XVII

MESOFAUNA

Jair Alves Dionísio
Diana Signor

A biota edáfica é representada por uma gama de organismos com diferentes tamanhos e metabolismos, aos quais se atribuem inúmeras funções no solo. A diversidade quantitativa, qualitativa, genética e funcional são suas características marcantes (LAVELLE et al., 1994).

Inúmeros são os grupos taxonômicos que compõem a fauna de invertebrados do solo. Algumas classificações, baseadas no tamanho do corpo e na sua mobilidade, são bastante difundidas entre os pedobiólogos tropicais (DUCATTI, 2002), porém algumas apresentam diferenças no limite das classes.

Lavelle et al. (1994) propuseram uma subdivisão da fauna edáfica de invertebrados apoiada no tamanho e na mobilidade dos organismos:

- Microfauna: animais higrófilos, ligeiramente mais móveis do que os micro-organismos, com tamanho microscópico ($< 0,2$ mm), que penetram nos capilares do solo. Frequentemente, possuem formas de resistência à seca com o períodos de quiescência, estado de desidratação ou de enquistamento (ASSAD, 1997).
- Mesofauna: organismos terrestres, com tamanho de 0,2 a 4,0 mm, higrófilos ou xerófilos, que se movimentam nos poros, nas fissuras e na interface entre a serapilheira e o solo. É formada por ácaros, colêmbolos, miriápodes, aracnídeos e diversas ordens de insetos, alguns oligoquetos e crustáceos. São decompositores primários e/ou secundários da matéria orgânica, exercendo função no processo de humificação do solo; e,
- Macrofauna: diâmetro corporal de 4,0 mm a 20,0 cm, acima disso, pertencem à megafauna (algumas espécies de oligoquetos, diplópodes, quilópodes e coleópteros). Ambos fragmentam os detritos vegetais e animais, modificam a estrutura do solo por meio de escavação e produção de coprólitos, constroem ninhos, cavidades, galerias e transportam material de solo.

A mesofauna é um conjunto de organismos que, apesar de extremamente dependente da umidade do solo, é terrestre. Como representantes da mesofauna, têm-se principalmente os representantes dos filos:

- Arthropoda – Aranae;
- Pseudoescorpione;
- Acari;
- Diplura;
- Protura;
- Collembola;
- Coleoptera;
- Diptera;
- Hymenoptera; e,
- Annelidae – Oligochaeta.

Os ácaros são considerados os microartrópodos mais diversos do solo, o que reflete na diversidade de hábitos alimentares do grupo (BRUSSARD et al., 1997). Despertam interesse em várias áreas de conhecimento do homem (AQUINO et al., 2006):

- Agricultura;
- Saúde;
- Produtos armazenados;
- Controle biológico; e,
- Estética.

Os ácaros de vida livre estão entre os mais importantes decompositores secundários (WOLLEY, 1990).

A mesofauna edáfica possui hábito gregário e sua distribuição no solo é heterogênea, concentrando-se próximo à superfície. Sua presença depende de diversos fatores, como:

- pH;
- Umidade;
- Temperatura do solo;
- Textura;
- Porosidade;
- Matéria orgânica;
- Fauna e flora edáficos;
- Cobertura vegetal;
- Interferência do homem;
- Clima;
- Região geográfica; e,
- Eventos naturais.

As mudanças no ambiente influenciam o número e as espécies remanescentes da mesofauna edáfica. Portanto, a avaliação do impacto de ações humanas no solo pode ser realizada por meio da avaliação da população de microartrópodos (SOCARRÁS, 1998; MORSELLI, 2004).

Estima-se que 95,0 % dos microartrópodos do solo sejam constituídos por Acari e Collembola (SEASTEDT; CROSSLEY JUNIOR, 1984) e são considerados bastante sensíveis a alterações do ambiente. Em decorrência dessas características, a mesofauna tem sido utilizada como indicadora de impactos ambientais em agroecossistemas (MELLO; LIGO, 1999).

Os colêmbolos são amplamente distribuídos no solo e na serapilheira, e têm como principal atividade promover a decomposição de resíduos orgânicos. Isso ocorre diretamente pela alimentação de resíduos orgânicos em decomposição e hifas fúngicas e, indiretamente, pelo estímulo no aumento dos micro-organismos envolvidos na decomposição (AQUINO et al., 2006). Em alguns ecossistemas terrestres, os colêmbolos podem atingir densidades de 10^4 a 10^5 indivíduos m^{-2} (PETERSON; LUXTON, 1982).

O equilíbrio ambiental dos solos pode ser medido pela observação das características populacionais de grupos de organismos específicos, considerados bioindicadores do grau de alteração ou fragmentação de um local (WINK et al.,

2005). Morselli (2004) afirma que um dos bioindicadores utilizados é o monitoramento da mesofauna e sua avaliação na decomposição dos resíduos a serem adicionados no solo.

O método dinâmico de extração de artrópodes mais indicado para o estudo da mesofauna edáfica é o do funil de Berlese-Tullgren (AQUINO et al., 2006). Marçal (2009), utilizando o método anteriormente citado, avaliou durante um ano, bimestralmente, a mesofauna em área de cultivo de cana-de-açúcar, submetida aos tratamentos:

- Palha + vinhaça;
- Sem palha e sem vinhaça;
- Palha sem vinhaça;
- Sem palha e sem vinhaça; e,
- Mata nativa.

Os autores observaram que houve predominância dos grupos acariforme > acari parasitiforme > formicidae > collembola arthopleona > protura > outros > collembola symphypleona.

PROTOCOLO XV

EXTRAÇÃO DA MESOFAUNA EDÁFICA PELO MÉTODO DO FUNIL DE BERLESE-TULLGREN MODIFICADO

1. Material

- Vidraria: frasco de vidro (100 mL) e placa de Petri (90 mm);
- Equipamentos: mesa extratora, microscópio estereoscópio (lupa) e microscópio ótico³;
- Solução preservativa (Tabela 22); e,
- Outros: funil de Berlese-Tullgren, modelo da UFPR: dimensões: diâmetro (7,5 cm), profundidade (4,5 cm), comprimento (28,0 cm) e abertura (malha de 2,0 mm), lâmpadas de 25 W, estilete entomológico, pinça cirúrgica, elástico de borracha, caixa plástica vazada e luva de proteção (nitrílica descartável).

Tabela 22. Solução preservativa para artrópodos do solo.

Reagente	Quantidade (mL L ⁻¹)
Álcool 70 %	700,0
Glicerina	20,0
Água q.s.p.	1.000,0

Fonte: Sautter (2001).

2. Metodologia

- Determinar previamente o número de amostras de solo a ser coletado (no mínimo 10);
- Realizar a amostragem, com o funil de Berlese-Tullgren, de forma representativa para a área em estudo;
- Separar serapilheira do solo e coletar a amostra de solo na camada superficial (0,0 a 5,0 cm);
- Revestir o funil de Berlese-Tullgren com saco plástico limpo e prendê-lo com elástico de borracha, para evitar perda de solo e, conseqüentemente, de animais;

³Informações complementares disponíveis em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAB-2010/34090/1/cit017.pdf>

- e) Transportar ao laboratório o conjunto: funil de Berlese-Tullgren e solo, cuidadosamente, acondicionando-o em caixa plástica vazada;
- f) Colocar as amostras coletadas com o funil de Berlese-Tullgren na mesa extratora;
- g) Verificar se as lâmpadas (25 W) estão dimensionadas e funcionando;
- h) Identificar os frascos coletores, de acordo com as amostras do campo;
- i) Colocar um frasco coletor embaixo do funil de Berlese-Tullgren contendo a solução preservativa (Tabela 22) até 70,0 a 80,0 % do volume;
- j) A extração deverá durar cerca de uma semana. Nesse período, verificar com frequência o funcionamento das lâmpadas e o nível da solução preservativa;
- k) Fechar o local onde será realizada a extração para evitar que insetos sejam atraídos pela luz durante o período noturno e prejudiquem o bom andamento da extração;
- l) Após o período de extração, recolher os frascos coletores;
- m) Filtrar o sobrenadante com papel filtro de filtragem rápida, sem agitar a amostra;
- n) Transferir, com uma pinça, o papel filtro para uma placa de Petri e quantificar os organismos na lupa ou microscópio;
- o) Identificar os organismos extraídos de acordo com a classe, ordem ou família, segundo a Ficha de Avaliação (Tabela 23); e,
- p) Para identificar as famílias de colêmbolos, utilizar os Anexos 5 e 6.

Tabela 23. Ficha de avaliação da mesofauna edáfica.

Amostra n°:		Data	
Coleta:			
Leitura:			
Identificação da amostra:			
Filo			
1. Arthropoda			
	Subfilo Chelicerata		
		Classe Arachnida	
			Subclasse Acari
			Superordem
			Parasitiforme
			Acariforme
			Ordem
			Aranae
			Pseudoscorpiones
	Subfilo Hexapoda		
			Indivíduos/ fúnil

Continua.

Tabela 23. Continuação.

		Classe Entognatha	Ordem					
			Diplura					
			Protura					
			Collembola		Subordem			
					Symphypelona			
					Arthropleona			
		Classe Insecta	Ordem					
			Coleoptera					
			Diptera					
			Hymenoptera		Familia			
	Subfilo Myriapoda				Formicidae			
		Classe						
		Chilopoda						
		Paupoda						
		Symphyla						
2. Annelidae								
	Classe Clitellata							

Continua.

Tabela 23. Continuação.

		Subclasse Oligochaeta	Ordem Haplotaxida					
				Subordem Tubificina			Família Enchytraeidae	
Outros								
Total								

Fonte: Marçal (2009).

3. Cálculo

O cálculo para estimativa da densidade da mesofauna é feito com base na área do círculo do funil de Berlese-Tullgren.

$$S = (\pi.d^2)/4$$

Onde:

π : 3,14...;

d: diâmetro do círculo \rightarrow 7,5 cm;

S: área do círculo \rightarrow 44,18 cm²;

1 m² = 10.000 cm²; e,

Fator de transformação: 10.000 cm²/44,18 cm² = 262,35.

4. Resultados

Expressar os termos absolutos (indivíduos/funil) e evitar extrapolar os dados para número de organismo por hectare ou m².

CAPÍTULO XVIII

MACROFAUNA

Diana Signor
Jair Alves Dionísio

A macrofauna edáfica compreende os maiores invertebrados. Segundo Lavelle et al. (1994), são organismos com diâmetro corporal de 4,0 mm a 20,0 cm, como minhocas, coleópteros em estado larval e adultos, centopeias, cupins, formigas, piolhos de cobra, tatuzinhos e aracnídeos.

De acordo com Gassen (1992), a fauna do solo pode ser classificada em função do habitat e dos hábitos alimentares em dois grupos:

1. Fauna do solo subterrânea: habita o horizonte A e raramente vem à superfície. Apresenta um conjunto de hábitos e características comuns, como movimentação e visão restritas, sensibilidades química e mecânica muito desenvolvidas, fotofobia, corpo despigmentado, defesa pela produção de toxinas, resistência ao gás carbônico, corpo coberto por estrutura cuticular hidrofóbica, formando um plastro que permite a respiração e a osmose durante períodos de chuva. É pouco afetada pelos eventos climáticos da atmosfera e pelo manejo da superfície do solo, destacando-se nesse grupo os corós ou *Diloboderus abderus* (Coleoptera: Melonthidae), os cupins (Isoptera: Termitidae) e as minhocas (Oligochaeta), que desempenham importante função na decomposição de compostos orgânicos (LAMPARSKI; LAMPARSKI, 1987); e,
2. Fauna de superfície: habita o horizonte O (orgânico), vive sob resíduos orgânicos, movimenta-se com agilidade, apresenta acuidade visual, sensores desenvolvidos e corpo pigmentado. É afetada pela cobertura vegetal e pelas práticas culturais. Pode penetrar no solo pelas rachaduras ou cavidades naturais. As espécies-praga alimentam-se de sementes ou plantas na região do colo ou da coroa e, algumas vezes, da parte aérea. Nesse ambiente, ocorrem os predadores, os parasitoides, os decompositores de material orgânico e se estabelecem os mais importantes eventos relacionados ao controle natural das populações de espécies-praga (GASSEN, 1992).

Organismos como térmitas, formigas, minhocas e larvas de coleópteros são denominados “engenheiros do ecossistema”, pois atuam na formação de galerias, ninhos, câmaras e bolotas fecais, que modificam as propriedades físicas dos solos onde vivem e a disponibilidade de recursos para outros organismos (WOLTERS, 2000). Por meio de suas ações mecânicas no solo, a macrofauna contribui para a formação de microagregados estáveis, que podem proteger parte da matéria orgânica de uma mineralização mais rápida e constituem, também, uma reserva de nutrientes potencialmente disponíveis para as plantas (LAVELLE; SPAIN, 2001; DECAËNS et al., 2003). Genericamente, um solo sob vegetação natural poderá conter (ASSAD, 1997):

- Térmitas: de 10^2 a 10^5 indivíduos m^{-2} ;
- Formigas: de 10^2 a 10^5 indivíduos m^{-2} ; e,
- Minhocas: de 1 a 5 ($\times 10^2$) indivíduos m^{-2} .

Em ambientes homogêneos, a densidade da macrofauna edáfica tende a ser alta e a diversidade, geralmente, diminui. De modo geral, a estrutura da comunidade da macrofauna edáfica apresenta-se estável no sistema sob vegetação nativa; é menos afetada pelas práticas de manejo dos solos mais conservacionistas e estimulam a dinâmica da matéria orgânica no solo, como os sistemas de integração lavoura-pecuária e plantio direto (SILVA et al., 2006).

Os impactos diretos das práticas agrícolas na comunidade do solo correspondem à ação mecânica da aração e da gradagem e aos efeitos tóxicos dos agrotóxicos. Os efeitos indiretos estão relacionados à modificação da estrutura do habitat e dos recursos alimentares. Assim, a retirada de serapilheira e ervas daninhas, bem como a compactação do solo e as monoculturas provocam simplificação do habitat, tendo como consequência a diminuição das comunidades do solo (CORREIA; OLIVEIRA, 2000).

A comunidade da macrofauna edáfica é um parâmetro sensível ao impacto de diferentes tipos de sistemas de produção, o que possibilita o seu uso como instrumento na determinação de opções de manejo sustentável dos sistemas agropecuários (SILVA et al., 2006). Segundo Baretta et al. (2003), os grupos Acarina, Hymenoptera, Isopoda e Collembola contribuem significativamente para discriminar sistemas de preparo e cultivo do solo. Esses autores, trabalhando com diferen-

tes sistemas de produção no cerrado, constataram que, no sistema plantio direto, havia maior diversidade de grupos, fato explicado pelo aumento da diversificação vegetal promovida pela rotação de culturas, o que garante condições favoráveis ao aumento da diversidade de grupos da macrofauna edáfica; e, maior densidade de predadores das ordens Arachnida e Chilopoda, que são capazes de promover o controle biológico de pragas agrícolas.

A metodologia mais empregada para o estudo da macrofauna do solo tem sido a do Programa de Biologia e Fertilidade dos Solos Tropicais (TSBF), da UNESCO (ANDERSON; INGRAM, 1993), no qual a amostragem é feita em bloco de solo (25 cm x 25 cm x 30 cm) ou por meio de armadilhas no solo, como exemplo a *Pitfall traps*, com ou sem uso de iscas. Para melhor compreensão dos aspectos ecológicos envolvidos entre os indivíduos, são calculados os índices: diversidade de Shannon, equitabilidade de Pielou e riqueza de espécies, assim como o uso da análise multivariada de dados.

PROTOCOLO XVI

MÉTODO DE EXTRAÇÃO DA MACROFAUNA EDÁFICA (ANDERSON; INGRAM, 1993)

1. Material

- a) Vidraria: frasco de vidro (250 mL);
- b) Equipamentos: microscópio fotônico e microscópio estereoscópio (lupa);
- c) Solução preservativa: álcool 70 % (Anexo 1); e,
- d) Outros: pá de corte, saco plástico, bandeja, pinça cirúrgica e luva de proteção (nitrílica descartável).

2. Metodologia

2.1. Etapa de campo

- a) Realizar o reconhecimento da área;
- b) Traçar um transecto de, no mínimo, 50 a 100 m, quando possível;
- c) Retirar entre 5 e 10 amostras (monólitos de 25 cm x 25 cm x 30 cm), distantes, no mínimo, 10 m entre si;
- d) Para cavar o monólito, separar o bloco de solo de 25 x 25 cm rapidamente com quatro pás retas;
- e) Fazer triagem da palhada ou da serrapilheira, manualmente, observar a presença de animais e armazená-los em álcool 70 %;
- f) Identificar os frascos, com lápis, de acordo com a identificação do campo;
- g) Cavar um buraco ao redor do monólito para auxiliar a retirada do solo;
- h) Retirar o solo de um lado (na frente) ou de dois lados (em forma de L) até 30 cm de profundidade. O solo do monólito será retirado em três camadas, de 10 cm cada uma; e,
- i) Colocar o solo de cada camada em saco plástico (50 L), previamente identificado, preservá-lo na sombra e encaminhá-lo ao laboratório para triagem. Se houver tempo e condições locais apropriadas, pode ser feita a triagem no campo.

2.2. Triagem, quantificação, identificação e pesagem

- Destorroar o solo, cuidadosamente, numa bandeja, separar os animais manualmente com uma pinça e transferi-los para frascos com álcool 70 %;
- Lavar bem os animais, numa bandeja plástica, com uma pisseta contendo água deionizada;
- Transferir os animais com uma pinça, para o papel toalha;
- Secar os animais por um minuto;
- Realizar a contagem e a pesagem dos animais em balança de precisão centesimal; e,
- Identificar os organismos extraídos (classe, ordem e/ou família), por meio de lupa, segundo a Ficha de Avaliação (Tabela 24).

Tabela 24. Ficha de avaliação da macrofauna edáfica.

Avaliador:			
Amostra n ^o :		Data:	
Coleta:		Leitura:	
Coletor:			
Grupo	Nome comum	Grupo funcional	Indivíduo (número m ⁻²)
1. Coleoptera	Besouros, larvas, corós	Rizófagos, predadores, detritívoros	
2. Oligoqueta	Minhocas	Geófagos, detritívoros, onívoros	
3. Isoptera	Térmitas, cupins	Geófagos, detritívoros, rizófagos	
4. Formicidae	Formigas	Fitófagos, predadores, detritívoros, onívoros	
5. Chilopoda	Centopeias	Predadores	
6. Diplopoda	Milipeias, piolho de cobra	Detritívoros	
7. Symphylla	Simfílicos	Detritívoros, predadores	
8. Aranae	Aranhas	Predadores	
9. Hemiptera	Percevejos	Rizófagos	

Continua.

Tabela 24. Continuação.

10. Homoptera	Cigarras, outros	Rizófagos, detritívoros	
11. Orthoptera	Grilos	Rizófagos	
12. Lepidoptera	Borboletas, mariposas	Fitófagos	
13. Diptera	Moscas	Detritívoros, predadores, parasitos	
14. Blattaria	Baratas	Detritívoros, fitófagos, onívoros	
15. Isopoda	Tatuzinhos	Detritívoros	
16. Dermaptera	Tesourinha	Detritívoros	
17. Gasteropoda	Caracóis	Fitófagos, detritívoros	
18. Pseudoscorpionidae	Pseudoescorpiões	Detritívoros, predadores	

Fonte: Aquino (1999).

3. Resultados

Apresentar os dados obtidos em forma de tabela, conforme a Ficha de Avaliação (Tabela 24), calculando a quantidade e, dentro do possível, realizar a identificação dos organismos da macrofauna edáfica encontrados nas amostras, conforme literatura especializada.

Expressar os resultados de densidade populacional (indivíduo m^{-2}) em termos absolutos e relativos. Evitar extrapolar os dados para número de organismos por hectare ou m^2 .

CAPÍTULO XIX

MINHOCAS

Jair Alves Dionísio
Diana Signor

No mundo, são conhecidas em torno de 8.800 espécies de minhocas, embora seja estimada uma diversidade ainda maior (REYNOLDS; WETZEL, 2007). Existem registros da presença de, aproximadamente, 310 espécies/subespécies de minhocas catalogadas no Brasil (BROWN; JAMES, 2007).

As minhocas têm função pedoecológica essencial. De acordo com Edwards e Bohlen (1996), realizam atividades que beneficiam as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, aumentando a aeração, a estabilidade de agregados, a infiltração de água, a mistura de materiais orgânico e mineral e a decomposição dos resíduos das plantas. Dessa forma, elevam a disponibilidade dos nutrientes, orgânicos e inorgânicos que, direta ou indiretamente, melhoram a produtividade do solo. Esses efeitos frequentemente (superior a 70 % dos casos) levam a aumentos no crescimento vegetal e na produtividade agrícola (BROWN et al., 2000). Também no aspecto biológico, trazem benefícios, pois dispersam micro-organismos na forma de células e/ou esporos, pelo deslocamento na superfície do solo e na construção de galerias, como também pelos excrementos “coprólitos”, que podem ser liberados dentro ou na superfície do solo.

De acordo com a classificação ecológica de Bouché (1977), as minhocas edáficas são classificadas em:

- Epigeicas: vivem em grande parte acima do solo mineral, habitam e se alimentam do horizonte orgânico, não constroem galerias, são pigmentadas e de tamanho reduzido. Exemplos: *Eisenia andrei* e *Eudrilus eugenia*;
- Anécicas: cavam galerias no solo mineral, vêm à superfície para se alimentar de *litter*, que incorporam ao solo, constroem galerias verticais extensas e permanentes; possuem pigmentação dorsal e são pouco conhecidas na América Latina (RIGHI, 1999). Exemplos: *Chibui bari*, *Lumbricus terrestres* e *Apporectodea longa*; e,

- Endogeicas: habitam o solo mineral, com preferência por material rico em matéria orgânica. Exemplo: *Pontoscolex corethurus* (minhoca mansa).

Segundo o hábito alimentar, as minhocas são consideradas onívoras, e alimentam-se, principalmente, de detritos orgânicos em vários estágios de decomposição, mas também integram a sua dieta:

- Micro-organismos vivos: bactérias, fungos e protozoários;
- Microfauna: nematoides e rotíferos; e,
- Fezes próprias ou de outros animais.

Assimilam menos de 10 % do material orgânico ingerido, restando nas fezes muito material em vários graus de processamento, assim como nutrientes que estão prontamente disponíveis às plantas.

Os coprólitos possuem secreções contendo humato de cálcio, produzidos no intestino das minhocas, bem como o cálcio liberado pelas glândulas calcíferas, que servem de cimento para as partículas do solo (EDWARDS; BOHLEN, 1996). Consistem em uma mistura heterogênea de restos orgânicos e de partículas minerais. No entanto, a quantidade de excrementos varia de acordo com (ZOU, 1993; TIUNOV; SCHEU, 2000):

- Idade;
- Tamanho;
- Estrutura da população;
- Época do ano;
- Qualidade da matéria orgânica ingerida;
- Temperatura;
- Disponibilidade de água; e,
- Textura do solo.

A produção pode atingir de 1,5 a 120 t ha⁻¹ ano⁻¹ em regiões temperadas e de 50 a 2.600 t ha⁻¹ ano⁻¹ em regiões tropicais (BAL, 1982; LEE, 1985).

As minhocas são lucífugas e dotadas de tigmotacismo positivo em todo o corpo. Assim, sua locomoção só é efetiva no meio de detritos vegetais ou no interior do solo (RUPPERT et al., 2005), pois constroem galerias ou “bioporos” dentro do solo, que predominam nos horizontes superficiais, mas podem chegar até às grandes profundidades nas formas horizontais e/ou verticais, com ramificações, mas também podem ser bloqueadas por raízes e fezes do próprio animal.

Amyntas spp. e *Pontoscolex corethrurus* que ocorrem em áreas com atividade antropogênica, vivem em galerias superficiais, ou seja, de 0 a 20 cm de profundidade (RIGHI, 1997).

Diversos fatores ambientais podem influenciar a reprodução, o crescimento, a atividade mecânica e a atividade metabólica desses animais, entre eles:

- Umidade;
- Aeração;
- Temperatura;
- Material alimentar; e,
- pH.

Os agroecossistemas são caracterizados pela alta degradação provocada pelo homem, em função de técnicas agrícolas como preparo do solo, cultivo, fertilização e tratamentos com agrotóxicos, como consequência causam impactos deletérios na população de minhocas.

A comunidade de minhocas presente em um determinado local é função de (BROWN; DOMÍNGUEZ, 2010):

- Condições edáficas: tipo de solo, mineralogia, teor de matéria orgânica, textura, estrutura, temperatura, umidade e valor de pH;
- Vegetação: espécie e cobertura;
- Topografia: posição fisiográfica e inclinação;
- Clima: precipitação, temperatura, umidade relativa do ar e vento;
- Interações com outros organismos edáficos; e,
- Condições históricas que originaram o solo e o local.

As comunidades de minhocas são mais expressivas em áreas de acúmulo de matéria orgânica. Freitas (2014), comparando sistemas de produção de hortas, convencional e orgânico, em Canoinhas – SC, obteve, respectivamente, densidades populacionais de 35,3 e 362,7 animais m⁻².

PROTOCOLO XVII

MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE MINHOCAS DO SOLO COM EXTRATO DE CEBOLA (STEFFEN et al., 2010)

1. Material

- a) Equipamentos: microscópio estereoscópio (lupa), microscópio fotônico, relógio, anel metálico (modelo da UFPR: 0,108 m de altura, 0,407 m de diâmetro e 0,1301 m² de área) e balança de precisão centesimal;
- b) Soluções: extrato de cebola 17,5 % e álcool 70 % (Anexo 1); e,
- c) Outros: béquer de polietileno, galão de 5 L, pinça metálica, pisseta, luva de proteção (nitrílica descartável), papel toalha e enxada.

2. Metodologia

2.1. Etapas de campo

- a) Realizar o reconhecimento da área;
- b) Traçar um transecto na área de amostragem, com, no mínimo, 50-100 m;
- c) Demarcar entre 5 e 10 amostras, distantes, no mínimo, 5,0 m entre si;
- d) Para cada local de amostragem, limpar uma área de aproximadamente 1 m², com uma enxada, retirando a cobertura vegetal;
- e) Fixar um amostrador (anel metálico) no solo e, cuidadosamente, com uma enxada, inseri-lo a aproximadamente 5,0 cm;
- f) Adicionar lentamente a solução de extrato de cebola 17,5 % dentro do anel metálico;
- g) Após a solução infiltrar no solo, aguardar 10 minutos; e,
- h) Com uma pinça metálica, coletar as minhocas que foram expulsas das galerias e transferi-las para um béquer contendo álcool 70 % e transportá-las para o laboratório.

2.2. Etapas de laboratório

- a) Manter as minhocas em álcool 70 % por um período de 3 a 6 h;
- b) Com uma pisseta, contendo água deionizada, lavar bem as minhocas; e,

- c) Secá-las em papel toalha por um minuto e, em seguida, realizar a contagem e a pesagem em balança de precisão centesimal.

3. Cálculo

Nº ou biomassa fresca m^{-2} = média dos cinco anéis (Rep.1+ ...+ Rep.5)/5 *fc¹

$${}^1fc \rightarrow 1 \text{ m}^2/\text{área do anel} (0,1301 \text{ m}^2) = 7,7$$

4. Resultados

Estimar a densidade populacional (Tabela 25) e a biomassa fresca (Tabela 26). De acordo com o Anexo 8, é possível realizar a identificação de algumas famílias de minhocas.

Tabela 25. Estimativa da densidade populacional de minhocas em diferentes solos.

Solo	Densidades (Nº m ⁻²)					Média
	I	II	III	IV	V	
A						
B						
C						
D						
E						

Tabela 26. Estimativa da biomassa fresca de minhocas em diferentes solos.

Solo	Biomassas (g m ⁻²)					Média
	I	II	III	IV	V	
A						
B						
C						
D						
E						

REFERÊNCIAS

AIDAR, M. P. M. et al. Dinâmica da produção e decomposição da serapilheira do araribá (*Centrolobium tomentosum* Guill. ex Benth – Fabaceae) em uma mata ciliar, Rio Jacaré-Pepira, São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 193-202, 2003.

ALEF, K. Soil respiration. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (Ed.). **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. London: Academic Press, 1995. p. 225-227.

ALEXANDER, M. **Introducción a la microbiología del suelo**. México: Libros y Editoriales, 1980.

ALVARENGA, R. C. et al. Plantas de cobertura de solo para sistema de plantio direto. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 22, n. 208, p. 25-36, 2001.

ANDERSON, J. M.; INGRAM, J. S. I. Soil fauna. In: _____. **Tropical soil biological and fertility: a handbook of methods**. 2. ed. Wallingford: C.A.B. International, 1993. p. 44-46.

ANDERSON, J. P. E. Soil respiration. In: PAGE, A. L.; MILLER, R. H.; KEENEY, D. R. (Ed.). **Methods of soil analysis**. 2. ed. Madison: American Society of Agronomy/Soil Science Society of America, 1982. p. 831-871.

ANDERSON, J. P. E.; DOMSCH, K. H. Quantities of plant nutrients in the microbial biomass of selected soils. **Soil Science**, Baltimore, v. 130, n. 4, p. 211-216, 1980.

ANDRÉA, M. M.; PETTINELLI JR., A. Efeito de aplicações de pesticidas sobre a biomassa e a respiração de microorganismos de solos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 67, n. 2, p. 223-228, 2000.

AQUINO, A.; CORREIA, M. E. F.; BADEJO, M. A. **Amostragem da mesofauna edáfica utilizando funis de Berlese-Tullgren modificado**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2006. (Circular Técnica, 17).

ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R. Indicadores biológicos de qualidade do solo. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, n. 3, p. 66-75, 2007.

ASSAD, M. L. L. Fauna do solo. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGIA, M. (Ed.). **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina: Embrapa/CPAC, 1997.

BAKER, G. H. et al. The life history and abundance of the introduced earthworms *Aporrectodea trapezoides* and *Aporrectodea caliginosa* in pasture soils in the Mount Lofty Range, South Australia. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 24, n. 12, p. 1389-1395, 1996.

BAL, L. **Zoological ripening of soil**. Wagenning: Agricultural Publications and Documentation, 1982. (Agricultural Research Report, 850).

BARETTA, D. et al. Fauna edáfica avaliada por armadilhas de catação manual afetada pelo manejo do solo na região oeste catarinense. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 2, n. 2, p. 97-106, 2003.

BARROS, Y. J. et al. Indicadores de qualidade de solos em área de mineração e metalurgia de chumbo. I – microorganismos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, n. 4, p. 1397-1411, 2010.

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

BERBARA, R. L. L.; DE SOUZA, F. A.; FONSECA, H. M. A. C. Fungos Micorrízicos arbusculares: muito além da nutrição. In: FERNANDES, M. S. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 53-88.

BERTOL, I.; LEITE, D.; ZOLDAN JR., W. A. Decomposição do resíduo de milho e variáveis relacionadas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 28, n. 2, p. 369-375, 2004.

BRANDÃO, E. M. Os componentes da comunidade microbiota do solo. In: CARDOSO, E. J.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 1-16.

BRASIL. Decreto-Lei n. 6.934, de 13 de julho de 1981. Altera a Lei n° 6.984, de 16 de dezembro de 1980, que dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes, estimulantes, ou biofertilizantes, destinados à agricultura, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 15 jul. 1980. Disponível em: <<http://www2.camara.gov.br/legin/fed/lei/1980-1987/lei-6934-13-julho-1981-357308-publicacaooriginal-1-pl.html>>. Acesso em: 17 fev. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Vigilância do câncer ocupacional e ambiental**. Rio de Janeiro: INCA, 2005.

BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2. ed. New York: Springer, 2004.

BROWN, G. G.; BAROIS, I.; LAVELLE, P. Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role of interactions with other edaphic functional domains. **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v. 36, n. 3-4, p. 177-198, 2000.

BROWN, G. G.; JAMES, S. W. Ecologia, biodiversidade e biogeografia das minhocas no Brasil. In: BROWN, G. G.; FRAGOSO, C. (Eds.). **Minhocas na América Latina: biodiversidade e ecologia**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. p. 297-381.

BRUNDETT, M. et al. **Working mycorrhizas in forestry and agriculture**. Canberra: Australian Center for Agricultural Research, 1966.

BRUNDRETT, M. C.; ASHWATH, N.; JASPER, D. A. Mycorrhizas in the Kakadu region of tropical Australia. I. Propagules of mycorrhizal fungi and soil properties in natural habitats. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 184, n. 1, p. 159-171, 1996a.

BRUSSARD, S. et al. Biodiversity and ecosystem functioning in soil. **Ambio**, Stokolm, v. 26, n. 8, p. 563-569, 1997.

BURTON, G. R. W.; ENGELKIRK, P. G. **Microbiologia: para ciências da saúde**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

CASIDA JUNIOR, J. L. Protozoan response to the addition of bacterial predators and other bacteria to soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 55, n. 8, p. 1857-1859, 1989.

CATTELAN, A. J.; VIDOR, C. Flutuações na biomassa, atividade e população microbiana do solo, em função das variações ambientais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 14, n. 2, p. 133-142, 1990b.

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

CERETTA, C. A. et al. Produção e decomposição de fitomassa de plantas invernais de cobertura de solo e milho sob diferentes manejos da adubação nitrogenada. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 49-54, 2002.

CERRI, C. C.; VOLKOFF, B.; EDUARDO, B. P. O ciclo do carbono (C) no solo. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. (Ed.). **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 59-71.

CHAVEZ, D. et al. **Combatendo o off-flavour na tilápia**. Disponível em: <<http://www.panoramadaaquicultura.com.br/paginas/revistas/112/InformeInve112.asp>>. Acesso em: 21 jun. 2011.

CLARK, F. E. Actinomyces. In: BLACK, C. A. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Madison: American Society of Agronomy, 1965. v. 2, p. 1498-1501.

CLARK, F. E. Aerobic spore-forming bacteria. In: BLACK, C. A. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Madison: American Society of Agronomy, 1965. v. 2, p. 1473-1476.

COLEMAN, D. C. The microbial loop concept as used in terrestrial soil ecology studies. **Microbial Ecology**, New York, v. 28, n. 2, p. 245-250, 1994.

COLLEMAN, D.; CROSSLEY, D. A. **Fundamentals of soil ecology**. San Diego: Academic Press, 1996.

COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO. **Recomendação de adubação e calagem do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 3. ed. Passo Fundo: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo - Núcleo Regional Sul, 1994.

CORREIA, M. E. F.; OLIVEIRA, L. C. M. **Fauna de solo:** aspectos gerais e metodológicos. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000. (Documentos, 112).

CUTOLO, S. A.; ROCHA, A. A. Correlação entre a microfauna e as condições operacionais de um processo de lodos ativados. In: CONGRESSO INTERAMERICANO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 27., 2000, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: ABES, 2000. p. 1-7.

DARRAH, P. R. The rhizosphere and plant nutrition: a quantitative approach. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 155/156, p. 1-20, 1993.

DECÄENS, T. et al. Impacto del uso de la tierra en la macrofauna del suelo de los Llanos Orientales de Colombia. In: JIMÉNEZ, J. J.; THOMAS, R. J. (Ed.). **El arado natural:** las comunidades de macroinvertebrados del suelo en las savanas neotropicales de Colombia. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 2003. p. 21-45. (Publicación CIAT, 336).

DE-POLLI, H.; FRANCO, A. D. **Inoculação de sementes de leguminosas.** Seropédica: Embrapa/UAPNPBS, 1985. (Circular Técnica, 1).

DIAS-JÚNIOR, H. E. et al. Metais pesados, densidade e atividade microbiana em solo contaminado por rejeitos de indústria de zinco. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 22, n. 4, p. 631-640, 1998.

DIONÍSIO, J. A. **Flutuações populacionais, biomassas e atividades microbianas em área cultivada com *Eucalyptus grandis* (W. Hill ex Maiden).** 1996. 98 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1996.

DUNLAP, P. V.; MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M. **Microbiologia de Brock.** 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

EDWARDS, C. A.; BOHLEN, P. J. The influence of environmental factors on earthworms. In: _____. **Biology and ecology of earthworms.** 3. ed. London: Chapman & Hall, 1996. p. 134-154.

EDWARDS, P. J. Studies of mineral cycling in a montane rain forest in New Guinea. **The Journal of Ecology**, Oxford, v. 65, n. 3, p. 971-992, 1977.

EIRA, A. F. Solubilização microbiana de fosfatos. In: CARDOSO, E. J.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 243-256.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja**: região central do Brasil 2011. Londrina: Embrapa Soja, 2010. (Sistemas de Produção, 14). Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/download/Sistema_Producao14_VE.pdf>. Acesso em: 12 mar. 2011.

FARIA, S. M.; FRANCO, A. A. **Identificação de bactérias eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies leguminosas arbóreas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2002. (Documentos, 158).

FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R. A aquisição de N por plantas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE NITROGÊNIO EM PLANTAS, 1., 1990, Itaguaí. **Anais...** Itaguaí: Unicamp, 1990. p. 172-192.

FISCHER, I. H. Efeito de fertilizantes e fungicidas na incidência da sarna da batata. **Batata Show**, Itapetininga, n. 11, 2005. Disponível em: <http://www.abbabatatabrasileira.com.br/revista11_007.htm>. Acesso em: 16 abr. 2007.

FREIRE, J. R. J. Fixação do nitrogênio pela simbiose rizóbio/leguminosa. In: CARDOS, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 12-140.

FREITAS, M. P. **Flutuação populacional de Oligochaeta edáficos em hortas cultivadas em sistemas orgânico e convencional no município de Canoinhas-SC**. 2007. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

GAMA-RODRIGUES, E. F.; DE-POLLI, H. Biomassa na ciclagem de nutrientes. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 6., 2000, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2000. v. 1, p. 1-14. CD-ROM

GASSEN, D. N. Classificação de pragas de solo de acordo com habitat e com os hábitos alimentares. In: REUNIÃO SOBRE PRAGAS SUBTERRÂNEAS DOS PAÍSES DO CONE SUL, 2., 1992, Sete Lagoas. **Anais...** Sete Lagoas: Embrapa/CNPMS, 1992. p. 179.

GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 46, n. 2, p. 235-244, 1963.

GILLER, K. E.; WILSON, K. J. **Nitrogen fixation in cropping systems**. Wallingford: C.A.B. International, 1991.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, Oxford, v. 84, n. 3, p. 489-500, 1980.

GISIN, H. **Collembolenfauna Europas**. Genève: Museum d'Histoire Naturelle, 1960.

GRAMINHA, E. B. N. et al. Avaliação *in vitro* da patogenicidade de fungos predadores de nematoides parasitos de animais domésticos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 22, n. 1, p. 11-16, 2001.

GRISI, B. M. Biomassa e atividade de microorganismos do solo: revisão metodológica. **Revista Nordestina de Biologia**, João Pessoa, v. 10, n. 1, p. 1-12, 1995.

HATTORI, T.; HATTORI, R. The physical environment in soil microbiology: an attempt to extend principles of microbiology to soil microorganisms. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 4, n. 4, p. 423-461, 1976.

HEIJNEN, C. E.; VAN VENN, J. A. A determination of protective microhabitats for bacteria introduced into soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 8, n. 1, p. 73-80, 1991.

HUNGRIA, M.; ARAÚJO, S. R. (Ed.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa/SPI, 1994.

INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ - IAPAR. **Amostragem de solo para análise química**: plantio direto e convencional, culturas perenes, várzeas, pastagens e capineiras. Londrina: IAPAR, 1996. (Circular, 90).

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO/WD 23611-1**: soil quality – sampling of soil, invertebrates. Geneva, Dec. 2002. Part 1: hand-sorting and formalin extraction of earthworms. Version 12.

ISLAM, K. R.; WEIL, R. R. Microwave irradiation of soil for routine measurement of microbial biomass carbon. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 27, n. 4, p. 408-416, 1998.

JASTROW, J. D.; MILLER, R. M. Methods for assessing the effects of biota on soil structure. In: CROSSLEY JUNIOR, D. A. et al. (Ed.) **Modern techniques in soil ecology**. Amsterdam: Elsevier Science, 1991. p. 279-303.

JENKINSON, D. S.; LADD, J. N. (1981): Microbial biomass in soil: measurement and turnover. In: PAUL, E. A.; LADD, J. N. **Soil biochemistry**. New York: Marcel Dekker, 1981. v. 5, p. 415-471.

JENKINSON, D. S.; POWLSON, D. S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil - V. A method for measuring soil biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 209-213, 1976.

JOPKIEWICZ, K.; SZTRANTOWICZ, H. Methods for the assessment of population density. In: GÓRNY, M.; GRÜM, L. **Methods in soil zoology**. Amsterdam: Elsevier, 1993. p. 142-155.

KIRK, P. M. et al. **Dictionary of the Fungi**. 10th ed. Wallingford: CAB International, 2008.

KLIEMANN, H. J.; BRAZI, A. J. P. B.; SILVEIRA, P. M. Taxas de decomposição de resíduos de espécies de cobertura em latossolo vermelho distroférico. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 36, n. 1, p. 21-28, 2006.

KODAKA, H. et al. Evaluation of a new agar médium containing cetrimide, kanamycin and nalidixic acid for isolation and enhancement of pigment production of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 43, n. 5, p. 407-413, 2003.

KUCEY, R. M. N. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v. 63, n. 4, p. 671-678, 1983.

KUSDRA, J. F. **Nodulação do feijoeiro e fixação biológica do nitrogênio em resposta à microbiolização das sementes e à aplicação de micronutrientes.**

2002. 128 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

LACAZ, C. S. et al. **Tratado de micologia médica.** 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LAMAPRSKI, F.; LAMPARSKI, K. A. R. The burrows of *Lumbricus badensis* and *Lumbricus polyphemus*. In: PAGLIAI, B.; OMODEO, P. (Ed.). **On earthworms.**

Modena: Mucchi, 1987. p. 131-140.

LAVELLE, P. et al. Soil function in a changing world: the role of invertebrate ecosystem engineers. **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v. 33, n. 4, p. 159-193, 1997.

LAVELLE, P. et al. The relationship between soil macrofauna and tropical soil fertility. In: WOOMER, P. L.; SWIFT, M. J. (Ed.). **The biological management of tropical soil fertility.** New York: Wiley-Sayce, 1994. p. 137-169.

LAVELLE, P.; BRUSSAARD, L.; HENDRIX, P. **Earthworm management in tropical agroecosystems.** London: CABI, 1999.

LAVELLE, P.; SPAIN, A. V. **Soil ecology.** Dordrecht: Kluwer Academic, 2001.

LEE, K. E. Earthworms of tropical regions – some aspects of their ecology and relationships with soils. In: SATCHELL, J. E. **Earthworm ecology: from Darwin to vermiculture.** London: Chapman and Hall, 1985. p. 179-193.

LEITE, L. F. C. et al. Estoques totais de carbono orgânico e seus compartimentos em argissolo sob floresta e sob milho cultivado com adubação mineral e orgânica. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, n. 2, p. 821-832, 2003.

LYNCH, J. M. **Biotecnologia do solo: fatores microbiológicos na produtividade agrícola.** São Paulo: Manole, 1986.

MACHADO, P. L. O. A. **Coleta de amostras de solos para análise (visando recomendação de adubos e corretivos).** Rio de Janeiro: Embrapa, 1999.

Disponível em: <http://www.cnpab.embrapa.br/servicos/analise_solos.html>.

Acesso em: 30 ago. 2010.

MARÇAL, C. T. **Efeitos da cultura da cana-de-açúcar e seu manejo (uso de vinhaça e método de colheita) sobre a mesofauna edáfica.** 2009.

112 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

MARTINS, L. M. V. et. al. **Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia das colônias de rizóbio.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1997. (Documento Técnico, 19).

MELLO, L. A. S.; LIGO, M. A. V. Amostragem do solo e uso de "litterbags" na avaliação populacional de microartrópodos edáficos. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, n. 3, p. 523-528, 1999.

MELO, I. S. Potencialidade de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas.** Jaguariúna, SP: Embrapa/CNPDA, 1991. p. 135-156.

MENZIES, J. D. Fungi. In: BLACK, C. A. (Ed.). **Methods of soil analysis.** Madison: Journal of the American Society of Agronomy, 1965. v. 2, p. 1502-1505.

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

MORSELLI, T. B. G. A. **Apostila da disciplina de biologia do solo.** Pelotas: Dep. Solos/FAEM/UFPel, 2004.

NAHAS, E. et al. Microorganismo solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatase em vários solos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 43-48, 1994.

NAKAGAWA, L. M.; ANDRÉA, M. M. Efeito de alterações nas características do solo sobre a degradação de hexaclorobenzeno. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 30, n. 3, p. 575-582, 2006.

NEVES, M. C. P.; RUMJANECK, N. Bioquímica da fixação de nitrogênio. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do solo.** Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 122-140.

OLSON, J. S. Energy storage and the balance of producers and decomposers in ecological systems. **Ecology**, Durham, v. 44, n. 2, p. 322-331, 1963.

PANKHURST, C. E. et al. Evaluation of soil biological properties as potential bioindicators of soil health. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v. 35, n. 7, p. 1015-1028, 1995.

PARKINSON, D. et al. **Methods for studying the ecology of soil microorganisms**. Oxford: Blackwell Scientific, 1971.

PASSIANOTO, C. et al. Atividade e biomassa microbiana do solo com a aplicação de dois diferentes lodos de curtume. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 7, n. 2, p. 125-130, 2001.

PETTERSON, H.; LUXTON, M. A. A comparative analyses of soil fauna e their role in decomposition processes. **Oikos**, Copenhagen, v. 39, n. 3, p. 287-388, 1982

POGGIANI, F. et al. Respiração edáfica em plantações de coníferas e folhosas exóticas em área de cerrado do estado de São Paulo. **IPEF**, Piracicaba, n. 14, p. 129-148, 1977.

POLYMAR. **A quitosana**. Disponível em: <<http://www.polymar.com.br/quitosana/quito.htm>>. Acesso em: 20 nov. 2011.

POWLSON, D. S. et al. Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in total soil organic matter due to straw incorporation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 19, n. 6, p. 159-164, 1987.

PRIMAVESI, A. M.; PRIMAVESI, A. Agregação de solos ácidos (arenosos e argilosos) pelos produtos da atividade de bactérias celulolíticas na decomposição semiaeróbia de palha. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 14., 1973, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1973. p. 334-357.

RAIJ, B. Van, et al. (Ed.). **Recomendações de adubação e calagem para o estado de São Paulo**. 2. ed. Campinas: Instituto Agrônômico, 1997. (Boletim Técnico, 100).

RAJU, A. et al. Nocardiopsins: New FKBP12-Binding Macrolide Polyketides from an Australian Marine-Derived Actinomycete, *Nocardiopsis* sp. **Chemistry European Journal**, Weinheim, v. 16, n. 10, p. 3194-3200, 2010.

RAW, F. Estimating the earthworm population by using formalin. **Nature**, London, v. 184, n. 4699, p. 1661-1662, 1959.

RIGHI, G. Minhocas da América Latina: diversidade, função e valor. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 26., 1997, Rio de Janeiro. **Resumos...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1997. 1 CD-ROM.

RIGHI, G. Oligoquetas. In: MACHADO, A. B. M. et al. (Ed.). **Livro vermelho das espécies ameaçadas de extinção da fauna de Minas Gerais**. Belo Horizonte: Biodiversitas, 1999. p. 573-583.

RODRIGUES, E. F. G. **Carbono e nitrogênio da biomassa microbiana do solo e da serapilheira de povoamentos de eucalipto**. 1997. 108 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1997.

RODRIGUES, E. F. G.; GUERRA, J. G. M.; ALMEIDA, D. L.; DE-POLLI, H. Biomassa microbiana de carbono de solos de Itaguaí-RJ; comparação entre os métodos fumigação-incubação e fumigação-extração. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 18, p. 427-432, 1995.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados**. 7. ed. São Paulo: Roca, 2005.

RYU, E. A simple method for differentiation between Gram-positive and Gram-negative organisms without staining. **Kitazato, Archives of Experimental Medicine**, Tokyo, v. 17, p. 58-63, 1940.

SAUTTER, K. D. Chave pictória para identificação de famílias (Collembola, Insecta). **Revista do Setor de Ciências Agrárias**, Curitiba, v. 13, n. 1-2, p. 79-82, 1994.

SCHEER, M. B. Decomposição e liberação de nutrientes da serapilheira foliar em um trecho de floresta ombrófila densa aluvial em regeneração, Guaraqueçaba (PR). **Floresta**, Curitiba, v. 38, n. 2, p. 253-267, 2008.

SCHLEGEL, H. G. **General microbiology**. 7. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1993.

SCHMIDT, O. et al. Earthworm communities in conventional wheat monocropping and low-input wheat clover intercropping systems. **Annals of Applied Biology**, London, v. 138, n. 3, p. 377-388, 2001.

SEABRIGHT, D. Wood chemistry: the essential ingredients. **Asian Timber**, Maharashta, v. 14, n. 7, p. 33-34, 1995.

SEASTEDT, T. R.; CROSSLEY JUNIOR, D. A. The influence of arthropods on ecosystems. **Bio Science**, Washington, v. 4, n. 3, p. 157-161, 1984.

SERRAT, B. M. et al. **Amostragem do solo**: perguntas e respostas. Curitiba: UFPR, 2002.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. As práticas de manejo do solo e a população microbiana. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 8, n. 3, p. 291-296, 1984.

SILVA FILHO; G. N.; VIDOR, C. Atividade de microorganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 12, p. 1495-1508, 2001.

SILVA, R. F. et al. Macrofauna invertebrada do solo sob diferentes sistemas de produção em latossolo da Região do Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 4, p. 697-704, 2006.

SILVEIRA, A. P. D. Avaliação de fungos micorrízicos arbusculares e sua importância ambiental. In: FRIGHETO, R. T. S.; VALARIN, P. J. (Coord.). **Indicadores biológicos e bioquímicos de qualidade do solo**: manual técnico. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. p. 61-76.

SILVEIRA, A. P. D. Micorrizas. In: CARDOSO, E. J.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 257-282.

SINGH, B. N. A method of estimating the numbers of soil protozoa, especially amoebae, based on their differential feeding on bacteria. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 33, n. 1, p. 112-120, 1946.

SIQUEIRA, J. O. **Biologia do solo**. Lavras: Esal/Faepe, 1993.

SIQUEIRA, J. O. et al. **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**. Lavras: Ed. UFLA, 2010.

SIQUEIRA, J. O.; COLOZZI-FILHO, A.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J. Efeitos da infecção de plântulas de cafeeiro com quantidades crescentes de esporos do fungo endomicorrízico *Gigaspora margarita*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 6, p. 875-883, 1994.

SIQUEIRA, O. J. et al. **Extração de esporos de fungos micorrízicos arbusculares**. Disponível em: <http://www.dcs.ufla.br/micorriza/fungos_micorrzicos_arbusculares.html>. Acesso em: 20 maio 2011.

SIQUEIRA, O. J. Microbiologia do solo: só simbioses? In: CURI, A. M. et al. (Coord.). **A responsabilidade social da ciência do solo**. Campinas: SBCS, 1988. p. 337-389.

SIQUEIRA, O. J.; FRANCO, A. A. **Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas**. Brasília: MEC/ABEAS/ESAL/FAEPE, 1988.

SMITH, E. S.; READ, J. D. **Mycorrhizal symbiosis**. 2. ed. New York: Academic Press, 1997.

SMITH, J. L.; PAUL, E. A. The significance of soil microbial biomass estimation in soil. In: BOLLAG, J. M.; STOTZKY, G. (Ed.). **Soil biochemistry**, New York: Marcel Dekker, 1990. p. 357-396.

SOCARRÁS, A. La vida del suelo: un indicador de su fertilidad. **Agricultura Orgânica**, La Habana, v. 4, n. 1, p. 12-14, 1998.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. **Methods in legume-Rhizobium technology**. Hawaii: Niftal Project and Mircen, 1985.

SOUZA, F. A. et al. Classificação e taxonomia de fungos Micorrízicos Arbusculares e sua diversidade e ocorrência no Brasil. In: SIQUEIRA, J. O. et al. **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**. Lavras: Ed. UFLA, 2010. v. 1, p. 442-474.

STEFFEN, G. K.; STEFFEN, R. B.; ANTONIOLLI, Z. I. **Diversidade de minhocas e sua relação com ecossistemas naturais e alterados no estado do Rio Grande do Sul**. 2012. 208 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Departamento de Solos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

STIRLING, G. R.; WACHTEL, M. F. Mass production of *Bacillus penetrans* for the biological control of root-knot nematodes. **Nematologica**, Leiden, v. 26, n. 3, p. 308-312, 1980.

STOTZKY, G. Microbial respiration. In: BLACK, C. A. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Madison: American Society of Agronomy, 1965. v. 2, p. 1550-1572.

SWIFT, M. J.; HEAL, O. W.; ANDERSON, J. M. **Decomposition in terrestrial ecosystems**. Oxford: Blackwell, 1979.

SYLVESTER-BRADLEY, R. et al. Levantamento quantitativo de microorganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras da Amazônia. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 12, n. 1, p. 15-22, 1982.

TALAVERA, J. A. Claves de identificación de las lombrices de tierra (Annelidae: Oligochaeta) de Canarias. **Vieraea**, Tenerife, v. 18, p. 113-119, 1990.

TANCK, B.; SANTOS, H. R.; DIONÍSIO, J. A. Influência de diferentes sistemas de uso e manejo do solo sobre a flutuação populacional do *Oligochaeta* edáfico *Amyntas* spp. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 24, n. 2, p. 409-415, 2000.

TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of Congored-polysacharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovines rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 43, n. 4, p. 777-780, 1982.

TIUNOV, A. V.; SCHEU, S. Microbial biomass, biovolume and respiration and *lumbricus terrestris* L. cast material of different age. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 32, n. 2, p. 265-275, 2000.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

TÓTOLA, M. R.; CHAER, G. M. Microorganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade do solo. In: ALVAREZ, V. et al. **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2002. v. 2, p. 195-276.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA. **Soil biology primer**. Washington: USDA, 1999.

VENTURA, M. et al. Genomics of *Actinobacteria*: tracing the evolutionary history of an ancient Phylum. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 71, n. 3, p. 495-548, 2007.

VIDOR, C. et al. **Fixação biológica do N pela simbiose entre *Rhizobium* e leguminosas**. Porto Alegre: Instituto de Pesquisas Agronômicas, 1983. (Boletim Técnico, 11).

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root nodules bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970.

WAID, J. S. Biological and biochemistry analysis of soils. **Plant and Soil**, The Hague, v. 76, n. 1-3, p. 127-137, 1984.

WILLIAMS, A. B. et al. Properties and attempted culture of *Pasteuria penetrans*, a bacterial parasite of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*). **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 67, n. 2, p. 145-156, 1989.

WINK, C. et al. Insetos edáficos como indicadores da qualidade ambiental. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 4, n. 1, p. 60-71, 2005.

WOLLEY, T. A. **Acarology-mites and human welfare**. New York: John Willey, 1990.

WOLTERS, V. Invertebrate control of soil organic matter stability. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 31, n. 1, p. 1-19, 2000.

ZOU, X. M. Species effects on earthworm density in tropical tree plantation in pastures. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 15, n. 1, p. 35-38, 1993.

ANEXO 1

Preparo de soluções diversas.

Solução	Concentração	Dissolver ¹	Completar (mL)
Álcool etílico	70,00 %	736,8 mL de álcool etílico 95,00 % em água	1.000
Azul de Bromotimol	0,05 %	0,05 g em água	100
BaCl ₂ ·2H ₂ O	50,00 %	122,23 g em água	1.000
Dimetilsulfóxido – DMSO	20,00 %	20,00 g	100
EDTA Sódico ²	0,25 M	26,27 g	250
Extrato de cebola ³	17,50	175,00 g em água	1.000
Fenolftaleína	0,10 %	0,10 g em álcool etílico 95,00 %	100
Glicerol	50,00 %	50 mL em água	100
Goma caseira ⁴	7,00 %	7,00 g de farinha de trigo em água	100
HCl ⁵	0,50 N	40,60 mL HCl concentrado em água	1.000
Hidróxido de potássio	10,00 %	10,00 g	100
Hipoclorito de sódio	5,00 %	5,00 g em água	100
KOH	3,00 %	3,00 g em água	100
NaCl	1,00 M	58,50 g em água	1.000
NaOH	0,50 M	20,00 g em água	1.000

Continua.

Anexo 1. Continuação.

Solução	Concentração	Dissolver ¹	Completar (mL)
Sacarose	116,00 %	116 g em água	100
Sacarose	60,00 %	600,00 g em água	1.000
Safranina	0,50 %	0,500 g em água	100
Salina (NaCl)	0,85 %	8,50 g de NaCl em água	1.000
Tinta de caneta tinteiro azul	5,0 %	5,0 mL e 95 mL de ácido acético	100

¹Usar água deionizada; ²Dissolver em água deionizada aquecida a 30 °C; ³Pesar 175,00 g de cebola branca sem casca, bater no liquidificador com 500 mL de água, durante um minuto e completar com água deionizada para um litro; ⁴Diluir a farinha de trigo em água de torneira e aquecer a mistura até a fervura. Deixar esfriar e guardar em geladeira até o uso; ⁵HCl concentrado (36,50 %; d = 1,19). Caso as especificações sejam diferentes, corrigir o volume de ácido a ser utilizado.

ANEXO 2

Teste de Gram em solubilidade com KOH (RYU, 1940)

- a) Selecionar colônias bacterianas puras (isoladas) das placas de Petri em meio de cultivo com no máximo 24 h;
- b) Limpar as lâminas de vidro previamente com álcool etílico;
- c) Pingar na lâmina de vidro três gotas de KOH 3 % (Anexo 1);
- d) Transferir, com a alça de sementeira, uma colônia ou parte dela para a lâmina de vidro;
- e) Misturar com a alça de sementeira até formar uma mistura homogênea e aguardar 30 segundos; e,
- f) Colocar a alça de sementeira sobre a mistura previamente obtida, erguer a 1 a 2 cm e verificar se há formação de fios viscosos.

Interpretação das observações:

- Gram positiva, a solução não rompe a parede celular e não forma fios; e,
- Gram negativa, a parede celular é rompida, libera o DNA e forma fios.

ANEXO 3

Determinação da capacidade de retenção de água do solo conforme Monteiro e Frighuetto (2000)

Dentre os fatores limitantes da atividade dos micro-organismos no solo, tem-se a capacidade de retenção de água, que é extremamente variável entre os solos, em função principalmente dos teores de argila e matéria orgânica. Dessa forma, a determinação desse atributo é fundamental para interpretação das análises microbiológicas, porém, para que seja aplicado corretamente, é necessário que os solos estejam nas mesmas condições de umidade, ou seja, na mesma capacidade de retenção de água. Os valores de capacidade de retenção de água são variáveis de acordo com a metodologia, podendo ser superiores a 100 %.

1. Material

- a) Solo úmido coletado da camada superficial (0 a 10 cm);
- b) Vidrarias: funil plástico (diâmetro 10 cm), pipetas* de 1 mL, frasco de vidro de 150 mL, béquer de 200 mL;
- c) Equipamentos: balança analítica com precisão de décimo de grama, estufa de secagem; e,
- d) Outros: papel filtro quantitativo, faixa preta, filtragem rápida (diâmetro 15 cm), suporte de madeira, filme plástico, espátula e luvas de proteção (nitrílica descartável).

2. Metodologia

- a) Para cada amostra, separar um conjunto formado por funil de vidro, papel filtro e frasco de vidro e determinar a massa. Realizar a avaliação em duplicata;
- b) Acoplar, em um suporte de madeira, o funil contendo o papel filtro e posicionar corretamente o frasco coletor abaixo do funil;
- c) Pesar 20,0 g de solo úmido, obtido conforme o Capítulo II (p. 14), previamente tamizado em peneira nº 10 (abertura de 2,00 mm) e transferi-lo com auxílio de uma espátula para o funil;
- d) Em um béquer, pesar em balança analítica 100 g de água destilada e adicioná-la ao solo em pequenos volumes. Cobrir o funil com filme plástico e deixar à temperatura ambiente;

- e) No dia seguinte, retirar a água retida na haste do funil, com batidas suaves no suporte de madeira e pesar o frasco coletor contendo a água percolada; e,
- f) Para cada amostra, é necessária a realização da prova em branco (sem a adição de solo).

3. Cálculo

Determinação da capacidade de retenção (CR) de água do solo (%)

$$CR (\%) = [(100 - AP) + AS]/SS \times 100$$

Onde:

AP: água percolada (g);

AS: água existente no solo (g); e,

SS*: massa do solo seco (g), obtido após a secagem do solo úmido (20 g) em estufa (105 °C) até massa constante.

3.1. Calcular a capacidade de retenção de água estabelecida = 60 (%) da CR.

$$\text{Capacidade de retenção estabelecida} = CR \times 0,6$$

3.2. Quantidade de água a adicionar para atingir CR (60 %)

$$\text{Água (mL)} = CR (60 \%) - AS$$

ANEXO 4

Padronização de solução de hidróxido de sódio 0,5 N

1. Introdução

O NaOH não é padrão primário, porque é higroscópico e sempre contém uma quantidade indeterminada de água e carbonato de sódio adsorvida no sólido. Isso significa que as soluções de NaOH devem ser padronizadas com um reagente padrão primário. O padrão primário mais utilizado nessa determinação é o ftalato ácido de potássio ou biftalato de potássio $\text{KHC}_8\text{H}_4(\text{COO})_2$. Pela estequiometria, um mol de biftalato neutraliza um mol de hidróxido de sódio.

As soluções de hidróxido de sódio atacam o vidro e dissolvem a sílica com formação de silicatos solúveis. A presença de silicatos solúveis causa erros e as soluções de hidróxidos devem ser conservadas em frascos de polietileno.

2. Material

- Equipamento: balança analítica, agitador magnético;
- Vidraria: bureta de 25 mL, balão volumétrico de 100 mL, béqueres de 250 e 500 mL, funil de vidro, conta-gotas, Erlenmeyer de 250 mL, pipeta de 10 mL;
- Reagentes: $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$, PM = 204,224 e NaOH, PM = 40,0; e,
- Outros: pisseta, suporte universal, garras e conta-gotas.

3. Metodologia

3.1 Preparo da solução de NaOH 0,5 M

Pesar aproximadamente 20,0 g de hidróxido de sódio em um béquer plástico de 500 mL e dissolver em água destilada fervida (livre de CO_2); transferir para um balão volumétrico de 1.000 mL com auxílio de um funil e completar com água destilada e armazenar em um recipiente com tampa. Separar 100 mL em um béquer de 250 mL, para a padronização, ou seja, determinação da molaridade real.

3.2 Preparo da solução de biftalato de potássio 0,5 M

- Pesar em triplicata 5,1056 g a 5,200 g de biftalato de potássio, seco por 2 h em estufa a 110 °C, em um béquer de 100 mL, utilizando balança analítica;
- Adicionar 25 mL de água destilada, agitando com um bastão de vidro até a completa dissolução. Com auxílio de um funil, transferir para um balão de 50 mL e completar com água destilada.
- Transferir aproximadamente 25 mL da solução para um béquer de 50 mL, em seguida pipetar 10 mL; e,
- Transferir, com auxílio de um funil, para um Erlenmeyer de 125 mL e adicionar duas gotas do indicador fenolftaleína (1 %).

3.3 Titulação

A solução de biftalato de potássio, após adição do indicador, será posicionada no sistema como titulado e o NaOH como titulante, a titulação terminará com a mudança de cor de incolor para rosa avermelhada.

4. Cálculo

Molaridade real do NaOH

$$m = (g/M) \cdot v$$

Onde:

m: molaridade real do NaOH;

g: massa do biftalato de potássio (g);

M: massa molar do biftalato de potássio (g); e,

v: volume de NaOH gasto na titulação (L).

Anexo 4. Determinação da molaridade exata de uma solução de NaOH.

Massa do $\text{HKC}_6\text{H}_4(\text{COO})_2$ (g)	Volume de NaOH (mL)	Molaridade real
1.		
2.		
3.		
Molaridade real (média de três repetições)		

ANEXO 5

Solução DESS (250 mL)

- a) Pesar 26,23 g de EDTA sódico (com peso molecular de 372, 24 g mol⁻¹, certificar-se de que o EDTA seja dissódico, a massa pode variar, dependendo do peso molecular), passar para um béquer e acrescentar água deionizada até completar 50 mL;
- b) Ajustar o pH da solução com NaOH (hidróxido de sódio) 1 molar (o pH inicial da solução está em torno de 3 a 4), adicionar a solução até atingir pH 7,5 (consumirá aproximadamente 50 mL, o EDTA começará a dissolver lentamente, pode-se aquecer a 30 °C para facilitar a dissolução);
- c) Depois de dissolvido todo o EDTA, acrescentar água deionizada até 200 mL;
- d) Acrescentar 50 mL de solução DMSO a 20 % (Anexo 1);
- e) Agitar manualmente durante alguns minutos;
- f) Adicionar NaCl até a saturação (formação de cristais no fundo do recipiente); e,
- g) Passar a solução para um frasco, tomando o cuidado de não verter os cristais precipitados no fundo, identificar e armazenar em lugar adequado.

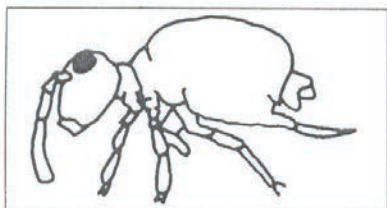
ANEXO 6

Chave pictória para identificação de famílias (Collembola, Entognatha) (GISIN, 1960)

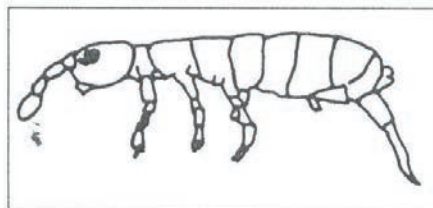
1. Corpo comprido. Os segmentos do tórax e abdômen visivelmente divididos (no máximo, os 2-3 fundidos) (Subordem Arthropleona).....2
 - Corpo arredondado. Tórax e os primeiros segmentos do abdômen unidos (Subordem Symphypleona).....5
2. Tórax I desenvolvido, com, no mínimo, uma pequena seta dorsal (Seção Poduromorpha).....3
 - Tórax I totalmente desprovido de setas e/ou pelos. Tergito do Tórax I não desenvolvido (Seção Entomobryomorpha).....4
3. Sem pseudocelos, maioria pigmentados. Com ou sem ocelos.....Poduridae
 - Com pseudocelos (geralmente poros na pele, nos vários segmentos do corpo). Maioria sem pigmentação, brancos. Sempre sem ocelos.....Onychiuridae
4. Corpo sem escamas. Com setas, em ponta. Sem pelos em forma de clava, na face dorsal. Abd. III e IV não diferem muito em comprimento.....Isotomidae
 - Corpo com escamas, ou, quando sem, pelo menos pelos em forma de clava, principalmente na região dorsal do tórax. Abd. IV geralmente mais longo que Abd. III. Fúrcula bem desenvolvida...Entomobryidae
5. Única família de Symphypleona.....Smynthuridae

ANEXO 7

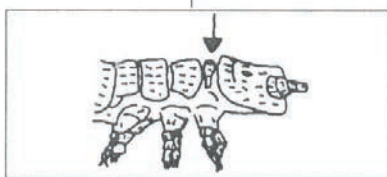
Chave pictória para identificação de famílias (COLLEMBOLA; SAUTTER, 1994)



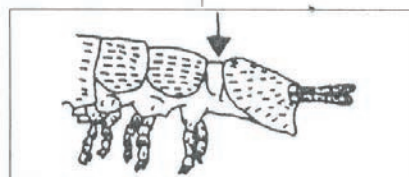
Corpo arredondado e abdômen não segmentado.
SUB-ORDEM SYMPHYPLEONA
FAMÍLIA SMINTHURIDAE



Corpo comprido e segmentado
SUB-ORDEM ARTHROPLEONA



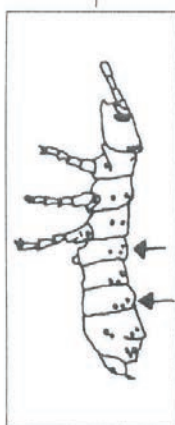
Tergito do torax I desenvolvido e com pêlos
(Seção Poduromorpha)



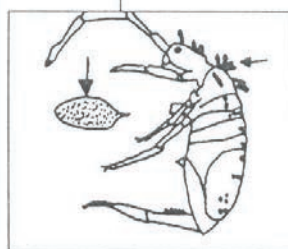
Tergito do torax I não desenvolvido e desprovido de pêlos
(Seção Entomobryomorpha)



Com ou sem ocelos.
Sem pseudocoel.
FAMÍLIA PODURIDAE.



Sem ocelos.
Com pseudocoel.
FAMÍLIA ONYCHIURIDAE.



Com ou sem escamas.
Com pêlos em forma de clava.
FAMÍLIA ENTOMBRYDAE.



Corpo sem escamas.
Com setas em ponta.
FAMÍLIA ISOTOMIDAE.

ANEXO 8

Chave para identificação de algumas famílias de Oligochaeta (TALAVERA, 1990)

1. Próstatas ausentes. Poros masculinos preclitelaes.....Lumbricidae
Próstatas presentes. Poros masculinos não preclitelaes.....2
2. Estrutura prostática do tipo racemosa. Poros masculinos posclitela-
res.....Megascolecidae
Estrutura prostática do tipo tubular. Poros masculinos em outra posição.....3
3. Sistema excretor meronefreniano.....Octochaetidae
Sistema excretor holonefreniano.....4
4. Glândulas calcíferas ausentes. Poros masculinos na margem posterior do
clitelo.....Acanthodrilidae
Glândulas calcíferas presentes. Poros masculinos geralmente intracelula-
res.....Ocnerodrilidae

PARCERIA



Sociedade Brasileira de Ciência do Solo

Núcleo Estadual do Paraná



PPGMPPat

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO

microbiologia, parasitologia e patologia



ISBN 85-69146-00-0



9 788569 146001