



XXIX Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas  
XIII Reunião Brasileira sobre Micorrizas  
XI Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo  
VIII Reunião Brasileira de Biologia do Solo  
Guarapari – ES, Brasil, 13 a 17 de setembro de 2010.  
Centro de Convenções do SESC

## Parâmetros microbiológicos como indicadores de alterações decorrentes do manejo do solo

**Rebeca Fuzinato Dall`Agnol<sup>(1)</sup>; Adriana Pereira da Silva<sup>(2)</sup>; Leopoldo Sussumu Matsumoto<sup>(3)</sup>; Leticia Babujia<sup>(4)</sup>; Renan Augusto Ribeiro<sup>(5)</sup>; Julio C. Franchini<sup>(6)</sup>; Mariangela Hungria<sup>(6)</sup>**

(1) Bióloga- Bolsista PROBIO II/Embrapa Soja (2) Doutoranda do Curso de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, CEP: 86051-980, drikapera@yahoo.com.br; (3) Professor da Universidade Estadual do Norte do Paraná Campus Luiz Meneghel, Bandeirantes, PR, 86360-000, leopoldo@uenp.edu.br; (4) Doutoranda do Curso de Química da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, CEP: 87020-900, leticiab\_@hotmail.com; (5) Doutoranda do Curso de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, renanribeiro83@hotmail.com; (6) Pesquisadores da Embrapa Soja, Londrina, PR, CEP: 86001-970, franchin@cnpsa.embrapa.br; hungria@cnpsa.embrapa.br

**RESUMO** – As diferentes práticas agrícolas promovem alterações distintas na biomassa e na composição da comunidade microbiana do solo. O objetivo do trabalho foi avaliar o carbono e o nitrogênio da biomassa microbiana (CBM e NBM), bem como a caracterizar o perfil da comunidade bacteriana em resposta a diferentes sistemas de manejo do solo. A biomassa microbiana foi analisada na camada de 0- 10 cm. O experimento foi estabelecido no verão de 1997/98, com dois manejos de solo (PD e PC [com arado de disco no verão e grade pesada no inverno]) e três sistemas de rotação de culturas (R), incluindo as culturas de soja, milho, trigo, trevo e aveia preta. O DNA total do solo foi amplificado para a região que codifica o gene 16S rRNA, utilizando os primers rD1 (5'-ccgaattcgtcgacaacAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e fD1 (3'-cccgggatccaagcttAAGGAGGTGATCCAGCC-5') e F (5'-CGCCCGGGGCGCGCCCGGGGCGGGGCGGGG GCACGGGGGAACGCGAAGAACCTC-3' e R 5'-GCGTGTGTACAAGACCC-3'). Valores superiores de CBM e NBM foram encontrados no PD, em comparação com o PC, demonstrando que a BMS é favorecida em sistemas com pouca movimentação do solo. Entretanto, diferenças em função das rotações não foram facilmente observadas, devido à complexidade de espécies vegetais utilizadas nas rotações. O agrupamento dos perfis de DNA que codificam o gene ribossomal 16S mostrou que a rotação de culturas também afetou qualitativamente a diversidade da comunidade bacteriana.

A presença de algumas bandas em todos os tratamentos indicou que existem grupos de bactérias que já se encontram estabelecidos no ambiente, independente do manejo do solo.

**Palavras-chave:** Biomassa microbiana, DGGE, Manejo do solo, Rotação de culturas

**INTRODUÇÃO** - Os microrganismos que compõem a biomassa microbiana estão diretamente relacionados à matéria orgânica, representando a chave que controla dos processos de mineralização-imobilização dos nutrientes na matéria orgânica. A microbiota é influenciada por diversos fatores, entre os quais os sistemas de cultivo, de rotação de culturas, a textura do solo (Venzke Filho et al., 2008).

A rotação de culturas é uma das características essenciais do plantio direto com qualidade; o seu uso é recomendado por aumentar a estabilidade dos agregados do solo, além de disponibilizar teores mais elevados de carbono ao solo quando é cultivada uma gramínea, ou de fixar N<sub>2</sub> atmosférico quando é cultivada uma leguminosa. A influência de determinada planta sobre a biomassa microbiana pode ser direta, como no caso do efeito seletivo da rizosfera, ou indireta, por meio da diversificação das fontes de carbono nos resíduos culturais, que podem ser mais ou menos suscetíveis à decomposição enzimática pelos microrganismos (Rahn e Lillywhite, 2001).

Segundo Vargas et al. (2004), o efeito dos sistemas de manejo sobre a microbiota, porém, não se restringe a aspectos quantitativos, como as

alterações na biomassa. A composição da comunidade microbiana também pode ser alterada, pois os grupos microbianos podem ser afetados diferentemente pelas práticas de manejo.

Dentre as metodológicas desenvolvidas para avaliar a diversidade genética e estrutural da comunidade microbiana, a técnica de DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*, -Eletroforese em gel de gradiente desnaturante) vem comprovando ser uma ferramenta útil no monitoramento de mudanças ambientais em função dos diferentes usos da terra (Ndaw et al., 2009; Green et al., 2010).

Uma vez que os microrganismos respondem rapidamente às alterações impostas ao ambiente, o monitoramento de mudanças microbiológicas pode atuar como indicador da qualidade do solo. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o carbono e o nitrogênio da biomassa microbiana do solo (CBM e NBM), bem como caracterizar o perfil da comunidade bacteriana em resposta a diferentes sistemas de manejo do solo.

**MATERIAL E MÉTODOS** - O experimento foi conduzido na área experimental da Embrapa Soja localizada em Londrina/PR, em um Latossolo Vermelho Eutroférrico, muito argiloso, contendo 71% de argila, 16% de silte e 12% de areia.

O experimento foi estabelecido no verão de 1997/98, com o delineamento experimental em blocos ao acaso em esquema fatorial, com dois manejos de solo (PD e PC [com arado de disco no verão e grade pesada no inverno]) e três sistemas de rotação de culturas (R), incluindo as culturas de soja, milho, trigo, trevo e aveia preta, ambos com quatro repetições. As rotações de culturas estão indicadas na Tabela 1. O ensaio foi constituído por parcelas de 15 m de comprimento por 8 m de largura. De cada parcela foram coletadas cinco subamostras deformadas de solo, provenientes da camada de 0-10 cm, nas entrelinhas, nas duas épocas de amostragem. Utilizou-se o método de fumigação-extração, modificado conforme descrito em Franchini et al. (2007).

O DNA total do solo da coleta de verão (safra 2006/07) foi amplificado para a região que codifica o gene 16S rRNA conforme descrito por Weisburg et al. (1991). Inicialmente, foram utilizados os primers rD1 (5'-ccgaattcgtcgacaacAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e fD1 (3'-cccgggatccaagcttAAGGAGGTGATCCAGCC-5'). Os produtos de PCR obtidos foram submetidos a uma nova amplificação, com os primers F 5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGG GCACGGGGGAACGCGAAGAACCTC-3' e R 5'-GCGTGTGTACAAGACCC-3'. A análise de

DGGE foi realizada conforme descrito por Souza et al. (2008).

Os parâmetros avaliados foram submetidos à análise de variância e aplicação do teste de Duncan a 5%, para comparação entre as médias. As análises de agrupamento genético dos perfis obtidos por DGGE foram realizadas utilizando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard, com tolerância de 5%.

**RESULTADOS E DISCUSSÃO** - A biomassa foi influenciada pelos sistemas de manejo do solo e das rotações de culturas de forma diferenciada (Tabela 2). Na avaliação realizada no verão, o CBM e o NBM apresentaram valores superiores de 18 e 100% quando comparados ao PC, respectivamente, e de 61 e 97% no inverno, respectivamente. Não houve diferenças significativas nos valores do CBM entre as rotações de culturas dentro dos manejos do solo (PD e PC), mas considerando a média dos valores de cada rotação em PD e PC, os maiores valores foram encontrados com a R1 no verão e a R3 no inverno. Para o NBM, os maiores valores foram encontrados na R1 no verão e na R2 no inverno, enquanto o PD resultou sempre em valores superiores de CBM e NBM. A maior incorporação de C e N pela biomassa microbiana em PD corrobora com outros estudos comparando PD e PC, além do que, estudos também têm demonstrado que o PD favorece as comunidades microbianas do solo (Franchini et al., 2007; Hungria et al., 2009). O NBM foi mais sensível que o CBM na resposta às alterações provenientes do manejo, sendo favorecido pela ausência de preparo do solo. Segundo Hernández- Hernández e López- Hernández (2002), os maiores valores de N no PD são um indicativo do maior potencial de mineralização do N nesse sistema.

As análises do DNA total do solo por DGGE (Figura 1), com *primers* para a região do DNA que codifica o gene ribossomal 16S de bactérias, mostra que algumas bandas estão presentes em todos os tratamentos, indicando a presença de grupos de bactérias que independente do tratamento encontra-se estabelecido no ambiente, conforme também constatado por Cenciani et al. (2009).

O dendograma não agrupou os tratamentos pelo nível de perturbação exercido no solo. Além disso, pode-se observar uma diferenciação no número de bandas dos tratamentos, indicando que a rotação de culturas foi o fator que mais afetou qualitativamente a diversidade da comunidade bacteriana do solo.

A variabilidade da comunidade bacteriana esta relacionada à composição dos resíduos culturais depositados no solo (Clayton et al., 2005). Embora alguns indivíduos ou populações possam ajustar a sua relação C:N à do substrato, é pouco provável

que toda a comunidade microbiana apresente esse comportamento (Wheatley et al., 1990).

Os perfis obtidos no PDR1 e PDR2 apresentaram o maior coeficiente de similaridade, 87,5%. Também agrupados nesse mesmo grupo aparecem os perfis PCR2 e PCR3, com uma menor similaridade. Um segundo grupo distinto foi formado pelo PDR3 e PCR1, que se diferenciaram dos demais tratamentos, por apresentarem um maior número de bandas.

**CONCLUSÕES** - O PD permite maior equilíbrio do sistema, gerando uma condição mais estável, que resulta em um aumento dos teores de C e N microbianos do solo, aumentando sua reserva lábil de nutrientes. Além de manejo do solo, os resíduos vegetais têm efeito direto na microbiota do solo, por alterar a estrutura da comunidade microbiana.

**AGRADECIMENTOS** - Trabalho financiado parcialmente pelo projeto PROBIO II/Embrapa.

## REFERÊNCIAS

CENCIANI, K.; LAMBAIS, M.R.; CERRI, C.C.; AZEVEDO, L.C.B.; FEIGL, B.J. Bacteria diversity and microbial biomass in forest, pasture and fallow soils in the southwestern Amazon Basin. R. Bras. Ciênc. Solo, 33:907-916, 2009.

CLAYTON, S.J.; CLEGG, C.D.; MURRAY, P.J. & GREGORY, P.J. Determination of the impact of continuous defoliation of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* on bacterial and fungal community structure in rhizosphere soil. Biol. Fertil. Soils, 41:109-115, 2005.

COOKSON, W.R.; OSMAN, M.; MARSCHNER, P.; ABAYE, D.A.; CLARK, I.; MURPHY, D.V.; STOCKDALE, E.A.; WATSON, C.A. Controls on soil nitrogen cycling and microbial community composition across land use and incubation temperature. Soil Biol. Biochem., 39:744-756, 2007.

FRANCHINI, J.C.; CRISPINO, C.C.; SOUZA, R.A.; TORRES, E.; HUNGRIA, M. Microbiological parameters as indicators of soil quality under various tillage and crop-rotation systems in southern Brazil. Soil Till. Res., 92:18-29, 2007.

GREEN, S.J.; LEIGH, M.B.; NEUFELD, J.D. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for microbial community analysis. In: TIMMIS, K.N. (Ed) Microbiology of hydrocarbons, oils, lipids, and derived compounds. p.4137-4158. Heidelberg, Germany: Springer, 2009.

HERNÁNDEZ- HERNÁNDEZ, R.M.; LOPEZ-HERNÁNDEZ, D. Microbial biomass, mineral nitrogen and carbon content in savana soil

aggregates under conventional and no-tillage. Soil Biol. Biochem., 34:1563-1570, 2002.

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; BRANDÃO-JUNIOR, O.; KASCHUK, G.; SOUZA, R.A. Soil microbial activity and crop sustainability in a long-term experiment with three soil-tillage and two crop-rotation systems. Appl. Soil Ecol., 42:288-296, 2009.

NDAW, S.M.; GAMA-RODRIGUES, A.C.; RODRIGUES, E.F.G. ; SALES, K.R.N.; ROSADO, A.S. Relationships between bacterial diversity, microbial biomass, and litter quality in soils under different plant covers in northern Rio de Janeiro State, Brazil. Can. J. Microb., 55:1089-1109, 2009.

RAHN, C.R.; LILLYWHITE, R.D. A study of the quality factors affecting the short – term decomposition of field vegetable residues. J. Sci. Food Agric., 82:19-26, 2001.

SOUZA, R.A.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; CHUEIRE, L.M.O.; BARCELLOS, F.G.; CAMPO, R.J. Avaliação qualitativa e quantitativa da microbiota do solo e da fixação biológica do nitrogênio pela soja. Pesq. Agrop. Bras., 43:71-82, 2008.

VARGAS, L. K.; SELBACH, P. A.; SA, E. L. S. de. Alterações microbianas no solo durante o ciclo do milho nos sistemas plantio direto e convencional. Pesq. Agropec. Bras., 39:749-755, 2004.

VENZKE FILHO, S.P.; FEIGL, B.J.; PICCOLO, M.C.; SIQUEIRA NETO, M.; CERRI, C.C. Biomassa microbiana do solo em sistema de plantio direto na região de Campos Gerais- Tibagi, PR. R. Bras. Ciênc. Solo, 32:599-610, 2008

WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol., 173:697-703, 1991.

WHEATLEY, R.; RITZ, K. & GRIFFITHS, B. Microbial biomass and mineral N transformations in soil planted with barley, ryegrass, pea or turnip. Plant Soil, 127:157-167, 1990.

**Tabela 1** Sistemas de rotação de culturas adotados para o ensaio

Rotações	Ver.	Inv.												
	00/01	01	01/02	02	02/03	03	03/04	04	04/05	05	05/06	06	06/07	07
R1	Ml	Av	Sj	Av	Sj	Tg	Sj	Tm	Ml	Av	Sj	Ps	Ml	Tg
R2	Sj	Tm	Ml	Tm	Ml	Tg	Sj	Av	Sj	Tm	Ml	Ps	Ml	Av
R3	Ml	Tg	Ml	Av	Ml	Tg	Ml	Av	Ml	Av	Ml	Ps	Ml	Tg

<sup>1</sup>Ml- Milho; Sj- Soja; Tg- Trigo; Av- Aveia; Tm- Tremoço; Ps- Pousio

**Tabela 2** Biomassa microbiana de C e N (CBM/NBM,  $\mu\text{g C}$  ou  $\text{N g}^{-1}$  solo seco) em diferentes sistemas de manejo do solo e rotação de culturas em Latossolo Vermelho Eutroférico na região de Londrina, PR .

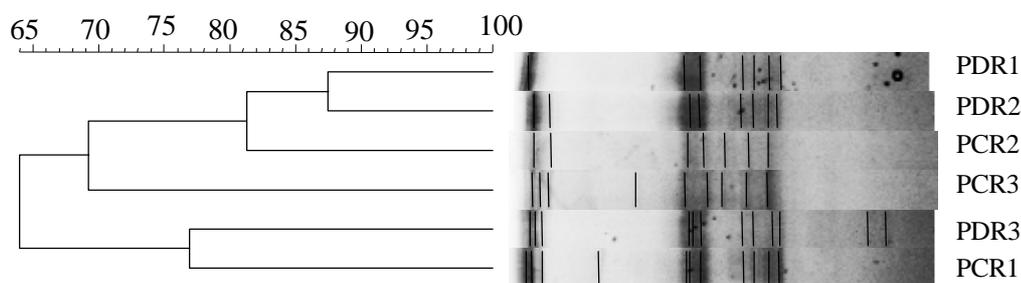
Manejos	Verão				Inverno			
	Tratamentos							
	CBM							
	R1 <sup>1</sup>	R2	R3	Média	R1	R2	R3	Média
PC <sup>2</sup>	264,1 A a	198,7 A a	227,3 A a	230,1 B	361,1 A a	322,1 A a	420,7 A a	368,0 B
PD	296,5 A a	277,3 A a	239,6 A a	271,1 A	528,9 A a	621,5 A a	625,8 A a	592,1 A
Média	280,3 a	243,6 ab	233,4 b		445,0 c	471,8 b	523,2 a	
	NBM							
	R1	R2	R3	Média	R1	R2	R3	Média
PC	36,1 B a	32,8 B a	39,2 B a	36,1 B	37,8 B a	37,4 B a	37,9 B a	37,7 B
PD	62,8 A b	75,3 A a	78,2 A a	72,1 A	74,5 A b	69,9 A c	76,5 A a	73,6 A
Média	49,5 b	54,1 ab	58,7 a		56,1 a	53,6 c	57,2 b	

Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ ).

<sup>1</sup> Rotação 1- aveia/soja/pousio/milho/trigo; Rotação 2- tremoço/milho/pousio/milho/aveia; Rotação 3- aveia/milho/pousio/milho/trigo

<sup>2</sup> PC- Plantio convencional

PD- Plantio direto



**Figura 1** Similaridade genética (%) entre os perfis de DNA total do solo, obtidos em seis tratamentos (PD- plantio direto; PC- plantio convencional; R1- aveia/soja/pousio/milho/trigo; R2- tremoço/milho/pousio/milho/aveia; R3- aveia/milho/pousio/milho/trigo). Os perfis foram obtidos após a amplificação com primers para a região do gene ribossomal 16S e eletroforese por DGGE. Os produtos foram analisados com o programa Bionumerics, com o algoritmo UPGMA, o coeficiente de Jaccard e um índice de tolerância de 5%.