

Análise de atividade microbiana do solo em diferentes sistemas de manejo e profundidades pelo método de hidrólise de diacetato de fluoresceína.

OLIVEIRA, K .B¹., NASCIMENTO, G.M¹., BRIZOLA, D.C¹., OLIVEIRA, T. B. M¹ ., ALMEIDA, A .M.R²., OLIVEIRA, M.C.N²|¹Universidade Norte do Paraná, ²Embrapa Soja, . Londrina, Paraná, e-mail: alvaro.almeida@embrapa.br.

Introdução

A atividade microbiana participa de diversos processos importantes no solo. Fungos, bactérias e actinobactérias atuam na formação do solo, decomposição de resíduos orgânicos, animais e vegetais, ciclagem de nutrientes, entre outros processos. Como os microorganismos também possuem seus requerimentos nutricionais, parte dos nutrientes liberados durante o processo de decomposição pode ser imobilizado na biomassa microbiana. ROSCOE et al. (2006) relatam uma relação bastante estreita entre o teor de matéria orgânica e a atividade microbiana do solo, mostrando que alterações significativas na biomassa microbiana podem ser detectadas com antecedência quando comparadas a mudanças na matéria orgânica do solo. Assim, a avaliação da atividade microbiana tem sido proposta como

indicador sensível do aumento ou diminuição do teor e da qualidade da matéria orgânica do solo, e no monitoramento de alterações ambientais decorrentes do uso agrícola. Diferentes métodos podem ser usados para medição da atividade microbiana, sendo ainda hoje, o método fumigação-extração descrito por VANCE et al., (1987) o mais utilizado. Dentre estes métodos, tem-se a medição da atividade microbiana do solo pela hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA), que avalia a atividade hidrolítica indiscriminada. Segundo COSTA et al. (2000), o FDA é hidrolisado por várias enzimas (lípsases, proteases e esterases), presentes nos microrganismos e vem sendo usado para avaliar a atividade microbiana do solo.

Este trabalho teve como objetivo determinar a atividade microbiana de amostras de solo em diferentes sistemas de manejo e profundidades por meio do método de hidrólise de diacetato de fluoresceína.

Material e métodos

As coletas foram realizadas na Fazenda Experimental da Embrapa Soja, Londrina/PR, em quatro áreas diferentes: uma área sob vegetação nativa, utilizada como referência para as determinações das propriedades microbiológicas do solo, e três outras áreas (pós-colheita), com cultivos de soja (*Glycine max (L.) Merril*), girassol (*Helianthus annuus L.*), e milho (*Zea mays L.*). O solo das quatro áreas foi caracterizado como Nitossolo Vermelho eutrófico. As práticas de manejo químico e biológico adotado (adubação, calagem e nutrição) foram as mesmas para todas as áreas, exceto para área IV.

As áreas avaliadas apresentavam as seguintes características:

- **Área I:** Consistiu de um cultivo anual de soja, manejada em sistema plantio direto (SPD) por dois anos consecutivos (de 2012 a 2014) sem rotação de culturas durante esse período.
- **Área II:** Consistiu de um cultivo anual de girassol, manejado nos últimos cinco anos em SPD, sem rotação com outras culturas durante esse período.

- **Área III:** Consistiu de um cultivo de milho, manejado nos últimos dois anos consecutivos em SPD.
- **Área IV:** Localizada paralelamente entre a área I e III, consistindo em uma faixa sob vegetação nativa.

As coletas foram realizadas por meio de um trado de 30 cm de profundidade, retirando-se o solo com auxílio de uma espátula na profundidade de 0-5 cm, 5-10 e, posteriormente, de 10-20 cm.

As amostras de solo foram homogeneizadas para obtenção das amostras compostas e acondicionadas em sacos de *polietileno*, *etiquetadas e levadas ao laboratório, onde se iniciou o processo de análise no período de 24h*. A determinação da umidade das amostras foi efetuada pelo método gravimétrico, secando em estufa 10g de solo de cada amostra a 104 °C por 24 h. Para o peneiramento das amostras foi utilizado malha de abertura 2,0 mm, antes deste processo, foram expostas ao ar, em temperatura ambiente, por uma hora.

A atividade microbiana foi determinada pelo método de hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) descrito por SCHUNER e ROSSWALL et al. (1982) e adaptado por COSTA et al. (2000).

A solução stock FDA foi incubada (banho Maria) a 100°C por 1 hora, e armazenada em câmara fria até o início das análises.

Para análise, foi colocado 5g de solo de cada amostra (em duplicata), em erlenmeyers com capacidade de 250ml, nos quais foram adicionados 20ml de solução tampão fosfato de potássio e 200µl de solução stock de FDA (0,2%), sendo transferidos para o agitador orbital por 20 minutos a 160rpm/min. Após esse processo, foi adicionado 20ml de acetona por amostra para paralisar a reação de hidrólise. A suspensão foi filtrada em filtro do tipo Watman 1 durante 10 minutos e, em seguida, realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro (modelo Gênesis 10uv), no comprimento de onda de 490nm, para a determinação da quantidade de fluoresceína hidrolisada.

Foi elaborada uma curva padrão nas concentrações de 0, 100, 200, 300 e 400 μ g de FDA já hidrolisado. Neste processo 5g de solo de cada amostra (em duplicata) foi colocado em erlenmeyer, no qual foi adicionado 15ml de solução tampão fosfato de potássio e o volume de cada tubo (5ml) da curva, de acordo com cada concentração, totalizando um volume de 20ml. Após isso, cada erlenmeyer foi transferido para o agitador orbital por 20 minutos a 160rpm/min. Foi adicionado 20ml de acetona por amostra e realizada a filtração durante 10 minutos. A leitura da absorbância em espectrofotômetro foi feita imediatamente após a filtração para evitar a evaporação da acetona, no comprimento de onda de 490nm.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em parcelas subdivididas. Em parcelas, quatro culturas (soja, girassol, milho e mata) e em subparcelas, três profundidades (0-5, 5-10 e 10-20cm). Com os valores das absorbâncias da curva, para cada tratamento, calculou-se a inclinação (b) e interceptação (a). Os resultados foram submetidos a análise de variância e foi aplicado o teste de comparações múltiplas de médias por Duncan ($p \leq 0,05$).

Resultados e Discussão

De acordo com a interação entre culturas, soja, girassol, e milho, a mata nativa foi o tratamento com maior atividade microbiana do solo. (Tabela 1) Na profundidade de 0-5 cm, observou-se que a quantidade de FDA hidrolisada foi de 2,99 μ g/FDA hidrolisado/g solo seco/min.

A quantidade de fluoresceína hidrolisada está relacionada com a maior quantidade de enzimas liberadas pelos microrganismos, o que pode estar diretamente associado com a quantidade de matéria orgânica das amostras. Assim, a maior atividade microbiana nas três profundidades avaliadas no tratamento com mata nativa pode ser atribuída ao maior acúmulo de matéria orgânica do solo, e também por uma maior biodiversidade vegetal em relação aos outros tratamentos.

Nas áreas sob uso agrícola cultivadas com soja, girassol e milho, os resultados obtidos foram semelhantes, mas relativamente menores

comparados aos índices de atividade microbiana da mata, que foi considerada como padrão nas condições deste estudo.

A análise da área de soja apresentou um valor médio de 1,70 μ g FDA hidrolisado/g solo seco/min. de solo na camada de 0-5 cm, demonstrando um pequeno acréscimo comparado as áreas de milho e girassol, que obtiveram 1,49 e 1,15 μ g FDA hidrolisado/g solo seco/min. de solo, respectivamente, na camada mais superficial do solo. Isto pode ser atribuído ao acúmulo de resíduos vegetais, na superfície do solo, relacionado ao SPD, o que provavelmente estimulou a atividade microbiana.

A atividade microbiana nas camadas 5-10 e 10-20 cm foi menor comparativamente à camada de 0-5 cm, em todos os tratamentos. Isto pode estar relacionado com a maior complexidade da matéria orgânica nas camadas mais profundas do solo, o que dificulta a ação dos microrganismos. Segundo HUNGRIA et al. (1995), restos vegetais que recobrem o solo influenciam na colonização dos microrganismos e sua atividade é maior nos cinco centímetros superficiais, devido a maior disponibilidade de nutrientes para os organismos do solo, provenientes de plantas vivas (raízes e outras estruturas subterrâneas) e de detritos (serapilheira, raízes mortas, exsudatos de raízes e matéria orgânica derivada da flora e da fauna).

O método de diacetato de fluoresceína mostrou-se eficiente como bio-índice da atividade microbiana, podendo ser utilizado para determinar a sua qualidade e auxiliar em estudos de monitoramento de solos. GODOI et al. (2001) também concluíram que o método de diacetato de fluoresceína foi um indicador eficaz da qualidade de solos de áreas degradadas, recuperadas ou nativas nos cerrados brasileiros

Conclusão

O solo da área da mata apresentou maior atividade microbiana, nas três profundidades amostradas e em todos os tratamentos a atividade das enzimas decresceu de acordo com o aumento das profundidades amos-

tradas, decorrente a diminuição do teor de matéria orgânica atribuído a cada cultura.

O método de diacetato de fluoresceína é um indicador sensível da atividade microbiana podendo ser utilizado no monitoramento da qualidade biológica do solo.

Referências

COSTA, J. L. S. et al. Biological control of Phytophthora root of avocado with microorganism grown in organic mulches. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo, v.31, n.4, p.239-246, 2000.

GHINI, R. et al. Método de hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) como indicador de atividade microbiana no solo e supressividade a *Rhizoctonia solani*. **Summa Phytopathologica**. Jaguariúna, v.24, n.3/4, p.239-241, 1998.

GODOI, L.C.L. Propriedades microbiológicas de solos em áreas degradadas e recuperadas na região dos cerrados goianos. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Goiás. 2001.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; COLOZZI FILHO, A.; BALOTA, E.L. & SANTOS, J.C. Ecologia microbiana em solos sob cultivo na região sul do Brasil. **Microbiologia do solo: Desafios para o século XXI**. Londrina, IAPAR/EMBRAPA - CNPSo, 1995. p.234-270.

ROSCOE, R.; MERCANTE, F. M.; MENDES, I. C.; REIS JUNIOR, F.B.; SANTOS, J. C. F.; HUNGRIA, M. Biomassa microbiana do solo: fração mais ativa da matéria orgânica. **Embrapa Agropecuária Oeste**. p. 163-198, 2006.

SILVA, M.; SIQUEIRA, E. R.; COSTA, J. L. S. Hidrólise de diacetato de fluoresceína como bioindicador da atividade microbiana de um solo submetido a reflorestamento. **Ciência Rural**. Santa Maria – RS. V.34, n.5,

SHUNER, J.; ROSSWALL, T. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v.43, p.1256-1261, 1982.

VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass.

Biochemistry. v. 19, p. 703-707, 1987.

Tabela 1: Relação entre a quantidade de FDA hidrolisado/g/solo seco/min de solo em diferentes sistemas de manejo e profundidade de avaliação. Embrapa Soja/Londrina-PR.

	0-5	5-10	10-20
Soja	1,70 b A ^(1,2)	1,45 b A	1,04 b B
Girassol	1,15 c A	1,04 b A	0,94 a A
Milho	1,49 bc A	1,17 b B	0,87 c C
Mata	2,99 a A	2,66 a A	2,80 a A

¹Medias transformadas em $\sqrt{(x + 0,5)}$.

²Medias seguidas de mesma letra minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem pelo teste Duncan ($p \leq 0,05$).