

MICROBIOLOGIA DO SOLO

2ª Edição



Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso

Fernando Dini Andreote



**Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso
Fernando Dini Andreote**

MICROBIOLOGIA DO SOLO

2ª Edição



Piracicaba, São Paulo

Coordenação editorial: Fernando Dini Andreote
Revisão de linguagem e figuras: Elke JBN Cardoso
Revisão bibliográfica: Eliana M. Garcia
Capa e diagramação: Silvio Bacheta

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso
Microbiologia do solo [recurso eletrônico] / Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso e
Fernando Dini Andreote. -- 2. ed. -- Piracicaba : ESALQ, 2016.
221 p. : il.

ISBN: 978-85-86481-56-7

1. Fixação biológica de nitrogênio 2. Micorrizas 3. Microbiologia do solo 4. Rizosfera
I. Andreote, F. D. II. Título

CDD 631.46
C268m2

DOI: 10.11606/9788586481567

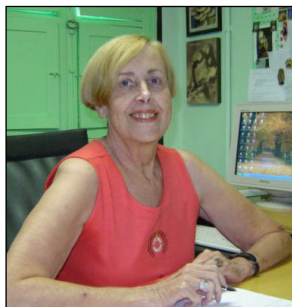
Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos,
desde que citada a fonte

Agradecimentos

Nossos agradecimentos são para aqueles que fazem parte de nossas trajetórias, tanto na vida profissional como familiar. Todo esforço na arte de disseminar o conhecimento só se justifica pelo bem-estar daqueles que nos rodeiam.

Desta forma, agradecemos a todo apoio de nossas famílias, e aos profissionais sobre os quais debruçamos nossos anseios, os quais certamente contribuíram de forma determinante para a geração deste documento. Destacamos nossos colegas de Departamento, nosso inestimável suporte técnico, conferido pelos profissionais Luís Fernando Baldesin e Denise de Lourdes Colombo Mescolotti, e nossos estudantes, sem os quais seria vazia nossa busca por conhecimentos da Microbiologia do Solo.

Nosso sincero e afetuoso Muito obrigado!



Elke J.B.N. Cardoso

ejbncard@usp.br

Área de atuação:

Microbiologia e
Bioquímica do Solo



Fernando Dini Andreote

fdandreo@usp.br

Área de atuação:

Microbiologia Molecular
e Ecologia Microbiana

PREFÁCIO

Estudos sobre microrganismos que habitam o solo vem apresentando uma importância cada vez maior. O solo é um sistema biológico dinâmico, considerado como o principal reservatório de diversidade biológica. Recentemente, destaque vem sendo dado aos microrganismos que vivem em associação com animais e com plantas; menos de 10% das células vegetais e animais são suplantadas pelo número de células microbianas que lá vivem e que, em geral, são benéficas aos seus hospedeiros. Algo semelhante ocorre no solo, cuja abundância média de vida comporta de 10^7 a 10^9 células microbianas com cerca de 10 mil diferentes espécies por grama de solo. Esta diversidade depende de fatores abióticos e, entre eles, a atmosfera do solo, água, pH e muitos outros cujas relações fazem parte das pesquisas em ecologia, uma das áreas abordadas no presente livro, que inclui também o metabolismo microbiano e as transformações do carbono, nitrogênio, enxofre e fósforo. É importante salientar que os livros texto sobre estes e outros tópicos provenientes de pesquisas realizadas, especialmente, por autores de países de clima temperado, embora comparativos, não representam muitas vezes o que ocorre em climas tropicais. O Brasil com seus diversos biomas, alguns ainda pouco explorados do ponto de vista de sua microbiota, possui características peculiares que necessitam ser melhor abordadas. Este é um dos pontos que torna altamente valiosa a presente publicação coordenada pelos docentes da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso e Fernando Dini Andreote. Com a qualidade e experiência dos idealizadores e com a participação nos seus vários capítulos de jovens pesquisadores pertencentes aos grupos dos coordenadores, o resultado foi o surgimento da

presente obra de alto valor científico e didático. Além dos capítulos mencionados acima, o texto apresenta uma série de outros, mostrando as relações microrganismos/solo/plantas, tais como a fixação biológica do nitrogênio, as micorrizas, e o microbioma da rizosfera, todas de valor aplicado nas áreas agrícola e biotecnológica. Outros capítulos apresentados, são muito atuais e informativos como o de biorremediação, que aborda impactos ambientais que ocorrem por influência humana, entre eles o uso indiscriminado de compostos químicos, sendo descritas tentativas de minimização, graças ao emprego dos microrganismos. Um capítulo final descreve os métodos independentes de cultivo de microrganismos, baseados na detecção e análise de ácidos nucléicos, ampliando de 90 até mais de 99% o conhecimento sobre a microbiota do solo. O livro traz no final de seus diversos capítulos, estudos de casos práticos, que levam o leitor a desenvolver seu espírito criativo procurando resolver aspectos relacionados à Microbiologia do Solo. A iniciativa dos organizadores contando com a participação de jovens pesquisadores está destinada a preencher uma lacuna que vai beneficiar estudantes de graduação, pós-graduação, pesquisadores e demais profissionais interessados no assunto. Ele deve permitir com que jovens valores sejam estimulados a desenvolver pesquisas e serviços nesta importante área que é a Microbiologia do Solo.

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

Professor Sênior da ESALQ/USP
Ex-presidente da Sociedade
Brasileira de Genética
Ex-coordenador da Área de
Microbiologia do Centro de
Biotecnologia da Amazônia



SUMÁRIO

- 09** | **Capítulo 1**
Introdução à biologia do solo
Fernando Dini Andreote, Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso
- 23** | **Capítulo 2**
O solo como ambiente para a vida microbiana
Simone Raposo Cotta
- 37** | **Capítulo 3**
Ecologia microbiana
Elisa Rabelo Matos, Ademir Durrer, Fernando Dini Andreote
- 47** | **Capítulo 4**
Rizosfera
Emiliana Manesco Romagnoli, Fernando Dini Andreote
- 61** | **Capítulo 5**
Metabolismo microbiano
Daniel Bini, Maryeimy Varón Lopez, Elke JBN Cardoso
- 81** | **Capítulo 6**
Transformações do carbono no solo
Carolina Braga Brandani, Danielle Gonçalves dos Santos
- 99** | **Capítulo 7**
Transformações do nitrogênio no solo
Armando Cavalcante Franco Dias

111

Capítulo 8

Fixação biológica de nitrogênio simbiótica

Alice de Sousa Cassetari, Mylenne Calciolari Pinheiro da Silva, Elke JBN Cardoso

133

Capítulo 9

Fixação biológica de nitrogênio associativa e de vida livre

Alice de Sousa Cassetari, Sandra Patrícia Montenegro Gomez, Mylenne C Pinheiro da Silva

149

Capítulo 10

Transformações microbianas do fósforo

Daniel Bini, Maryeimy Varón Lopez

167

Capítulo 11

Transformações do enxofre

Maryeimy Varón Lopez, Daniel Bini, Marcus Venicius de Mello Lourenço

179

Capítulo 12

Micorrizas

Rafael Borges da Silva Valadares, Denise LC Mescolotti, Elke JBN Cardoso

197

Capítulo 13

Biorremediação

Cristiane Cipolla Fasanella, Elke JBN Cardoso

211

Capítulo 14

Introdução aos métodos independentes de cultivo no estudo da microbiologia do solo

Ademir Durrer, Fernando Dini Andreote

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO À BIOLOGIA DO SOLO

Fernando Dini Andreote, Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso

1.1. Introdução

Parte essencial do sistema solo, os organismos que o habitam possuem funções de grande importância, sendo estas consideradas atualmente como mais importantes do que previamente imaginado. Pode-se enumerar dentre as mais diferentes funções atribuídas a estes, algumas amplamente conhecidas, como a degradação de compostos orgânicos, e conseguinte ciclagem de nutrientes (GILLER, 1996; MIRANSARI, 2013), e aquelas mais específicas, como a fixação biológica de nitrogênio (RAYMOND et al., 2004; BALDANI et al., 1997), ou o auxílio às plantas na absorção de nutrientes (MIRANSARI, 2013; CHAGNON et al., 2013).

No entanto, antes de comentar mais especificamente sobre estas funções, faz-se necessário descrever os grupos de organismos que fazem parte da fração viva do solo pois estes são amplamente diversos (BRADY; WEIL, 2013), englobando desde organismos procarióticos, como bactérias e arqueias (que compreendem dois dos três domínios da vida); até os organismos eucarióticos, onde se destacam os fungos. Também estão presentes os insetos, os nematóides, os protozoários, as algas, as oligoquetas (minhocas); e até mesmo os vírus, que tem seu papel ainda pouco explorado neste ambiente (BRADY; WEIL, 2013).

Os diferentes grupos de organismos presentes no solo são comumente estudados separadamente dando origem a separações didáticas dos mesmos, como a divisão na assim chamada fauna do solo: macrofauna (organismos maiores), mesofauna (de tamanho intermediário) e microfauna do solo (organismos menores) (GILLER, 1996). Dentre as funções atribuídas aos componentes da fauna do solo se destacam a degradação inicial de componentes orgânicos (incorporação e trituração), e a atuação na estruturação dos solos (GILLER, 1996), sendo estes organismos também usados para se correlacionar a qualidade do solo com a presença ou abundância dos mesmos (CAMARA et al., 2012; BARTZ et al., 2013). Já em relação aos organismos de menor tamanho, as funções são mais numerosas, principalmente devido à maior diversidade metabólica encontrada em bactérias, fungos e arqueias quando comparados aos demais organismos componentes da biologia do solo. Esta maior diversidade está diretamente relacionada à variabilidade genética e metabólica presente em tais organismos, o que se deve a sua origem e evolução, tornando-os o componente principal do metabolismo do sistema solo. Esta essencialidade é resultado das funções desempenhadas de forma exclusiva pelos microrganismos, e por sua dominância numérica sobre os demais (GILLER, 1996). Assim sendo, pode-se justificar a essencialidade do conhecimento sobre a organização dessas comunidades e seu funcionamento para o completo entendimento do sistema solo.

Ainda dentro de linhas gerais, pode-se enumerar duas características microbianas tidas como os maiores exemplos do benefício dos microrganismos no desenvolvimento vegetal: a fixação biológica do nitrogênio e a formação de micorrizas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; RAYMOND et al., 2004; MOREIRA et al., 2007; CHAGNON et al., 2013; SIQUEIRA et al., 2010). Essas características são amplamente estudadas, sendo que muitos detalhes que regem estes tipos de simbioses são descritos na literatura. No entanto, a diversidade microbiana presente nos solos é enorme, e muitos outros processos podem ocorrer em caráter essencial na manutenção deste sistema, influenciando o desenvolvimento das plantas. Assim, o grande desafio reside em descrever esses processos e manipulá-los de forma otimizada, obtendo assim maior eficiência energética na produção vegetal. A visão de uma vasta diversidade microbiana é ainda recente, uma vez que esta foi apenas obtida com a utilização de métodos independentes de cultivo. Novas tecnologias têm permitido acessar e entender com maior profundidade a complexidade biológica do sistema solo.

1.2. Diversidade microbiana em solos de biomas brasileiros

A fração viva do solo é essencial para seu funcionamento, sendo a esta atribuídos muitos processos que regem a manutenção e a funcionalidade dos solos. No entanto, o desempenho de funções similares em solos distintos pode ser tanto realizado pelo mesmo grupo de organismos, ou por organismos distintos, o que leva à necessidade de compreender a composição e o funcionamento metabólico do microbioma (ver definição abaixo) dos solos que sustentam os biomas brasileiros.

Considerando as áreas naturais, temos ainda pouco conhecimento sobre a microbiologia dos solos dos principais biomas brasileiros, principalmente devido à extensão do território nacional, o que gera a necessidade de grandes esforços amostrais, o que por vezes é limitado ao acesso restrito a áreas mais remotas de nossa nação.

Poucos estudos acessaram os microrganismos existentes na caatinga, sendo um deles desenvolvido por Gorchach-Lira Coutinho (2007), que estudaram a dinâmica populacional de bactérias presentes na rizosfera de *Aristida adscensionis* (Poaceae), na qual foi observada uma prevalência de bactérias mesofílicas heterotróficas formadoras de esporos e actinobactérias, sugerindo o desenvolvimento de adaptações especiais às condições ambientais pelos microrganismos, da mesma forma que é observado para plantas e animais. Mais recentemente, Kavamura et al. (2013) relataram a predominância do efeito da rizosfera de plantas da caatinga, como o mandacaru, na época das chuvas, sugerindo que as sucessões de determinados grupos microbianos se dão de acordo com variações no ciclo de vida das plantas que habitam essas regiões.

Dentro do bioma Amazônia, o tema em que se tem maior número de estudos científicos é o efeito do desmatamento sobre a diversidade e a estrutura das comunidades microbianas do solo e associadas às plantas. Neste sentido, um trabalho recente mostrou a homogeneização da microbiota em áreas de floresta convertidas para o uso como pastagem, indicando que a remoção da floresta diminui a beta diversidade¹ deste bioma (RODRIGUES et al., 2013). Este efeito possivelmente é uma consequência da desestruturação física natural do solo, o que resulta em maior exposição de nutrientes e consequentemente em novos nichos a serem ocupados pela microbiota.

Em relação à Mata Atlântica, os estudos são escassos sobre a microbiologia do solo. Santos et al. (2014) demonstraram a alta variabilidade

¹Beta diversidade: diversidade entre locais distintos, que revela a heterogeneidade na estrutura das comunidades.

espacial na composição da comunidade microbiana dentro de uma mesma área amostral. Neste ambiente, destaca-se a descrição das comunidades bacterianas da filosfera das plantas, revelando a grande diversidade microbiana ainda não conhecida e que ocorre de maneira específica para cada espécie vegetal habitante deste sistema (LAMBALIS et al., 2006). Ainda dentro da Mata Atlântica, diversos ecossistemas podem ocorrer, dentre os quais estão os manguezais, cujas comunidades microbianas vêm sendo amplamente descritas em estudos que revelam sua taxonomia (ANDREOTE et al., 2012) e funcionalidade (GOMES et al., 2008; ANDREOTE et al., 2012; DIAS et al., 2012; VARON-LOPEZ et al., 2014). Vários destes trabalhos indicam a ocorrência de grupos de genes e de organismos possivelmente endêmicos, o que pode ser resultado de uma combinação particular de fatores de seleção que ocorrem neste ambiente.

Vale ainda comentar que um dos biomas mais explorados atualmente no Brasil é de origem antrópica, e ocorre sobre os mais diferentes tipos de solo, de forma imersa aos demais biomas. O bioma agrícola, presente de forma fracionada e diferenciada ao longo de todo o território nacional, ocupa atualmente cerca de 70 milhões de ha, o que corresponde a aproximadamente 8,2% do território nacional (IBGE – fevereiro de 2014). Este bioma originou-se como consequência das alterações em propriedades físicas, químicas e biológicas dos solos, sendo importante a inclusão do mesmo em aproximações que buscam entender o funcionamento e as características de solos brasileiros. Neste bioma, o principal foco de estudo é o efeito da mudança do uso do solo sobre as comunidades microbianas e as possibilidades de uso dos mesmos para a obtenção de maior produtividade agrícola. Em relação à mudança do uso do solo, diversos estudos têm utilizado áreas de expansão agrícola como modelo (KAHINDI et al., 1997; JESUS et al., 2009). Um dos exemplos deste tipo de estudo acessou a comunidade bacteriana em solos de áreas naturais do Pampa, e comparou esta comunidade com as encontradas no mesmo solo com diferente tipo de uso (LUPATINI et al., 2013). Os autores verificaram que a mudança no uso da terra levou a alterações taxonômicas, mas não funcionais nos solos estudados. Rodrigues et al. (2013) revelaram a homogeneização que ocorre na microbiota dos solos quando seu uso é convertido de uma área nativa para a produção de pastagem. Mendes et al. (2014) revelaram o efeito determinístico da rizosfera de soja sobre a comunidade microbiana de um solo da Amazônia. Estes estudos sugerem que o cultivo das plantas acarreta a seleção de determinados grupos microbianos, o que explica a homogeneização dos solos, e a consequente

redução da beta-diversidade (características dos biomas naturais) em áreas de cultivo agrícola.

É um dos aspectos altamente relevantes da microbiologia do solo, cada vez mais pesquisada, é a grande quantidade de "serviços ambientais" ou "serviços do solo" que são prestados por grande variedade de microrganismos do solo, auxiliando de uma maneira fundamental os sistemas agrários e naturais. Tal como se reconhece hoje, a importância ímpar das abelhas para a polinização da maioria das plantas, tanto na natureza como na agricultura, também se verificou a presença de bactérias e fungos, além de arqueias, algas e protozoários, que atuam na proteção de plantas contra doenças e pragas, na fixação biológica de N_2 , na solubilização de fosfatos, no fornecimento de hormônios vegetais, na transferência de nutrientes diretamente do solo para as raízes e em muitas outras funções. Esses serviços ecológicos, de valor inestimável, que ocorrem normalmente nos ecossistemas naturais e que mantêm saudável e íntegra uma floresta como a Amazônica, também surgem em sistemas agrícolas, desde que manejados de uma forma alternativa, que valoriza acima de tudo a manutenção e a otimização desses serviços ambientais, resultando em economia de insumos industriais com aumento de produtividade e em maior saúde dos consumidores desses produtos (KLOPPER; SCHROTH, 1978; ADESEMOYE; KLOPPER, 2009). Também no Brasil já existem várias pesquisas que mostram o benefício dessas pesquisas (RIBEIRO; CARDOSO, 2011; VASCONCELLOS; CARDOSO, 2009; SIQUEIRA et al., 2010).

1.3. O termo microbioma

O termo microbioma foi usado pela primeira vez por Joshua Lederberg, que o definiu como 'a comunidade ecológica de microrganismos comensalistas, simbiotes ou patogênicos, que literalmente ocupam o espaço de nosso corpo', se referindo nesta ocasião ao microbioma humano (LEDERBERG; MCCRAY, 2001). Já em 2002, esta definição foi simplificada como 'microrganismos associados aos humanos' (The Human Microbiome Project Consortium, 2012). Sabe-se hoje que o Microbioma Humano é composto por 10 vezes mais células microbianas do que o número de células humanas que compõem nosso corpo. Alguns dos exemplos da funcionalidade deste 'órgão microbiano' revelam que 36% das moléculas encontradas em nosso sangue são produzidos por microrganismos associados ao nosso trato digestivo (NICHOLSON et al., 2012). Outro trabalho mostra a resposta fenotípica de camundongos

inoculados com microbiomas oriundos de indivíduos obesos ou magros, nos quais se observou o fenótipo do organismo doador em receptores desprovidos de microbiota própria (TURNBAUGH et al., 2006).

Atualmente este termo é usado para descrever o conjunto de microrganismos que habitam um determinado hospedeiro, ou que ocupam conjuntamente um ambiente (BOON et al., 2014). Boon et al. (2014) propõem que a melhor definição de microbioma seria aquela relacionada ao conjunto de genes encontrados de maneira associada aos organismos que colonizam um determinado ambiente. Esta definição é estruturada de forma a eliminar as variações causadas quando apenas inferências taxonômicas são feitas para caracterizar os microbiomas. Apesar da informação taxonômica ser a forma mais utilizada para este tipo de estudo, sabe-se que comunidades microbianas complexas apresentam altas taxas de transferência de material genético, o que faz com que as funções ecológicas e metabólicas possam ser exercidas por organismos distintos (redundância metabólica), tornando a descrição taxonômica dependente de uma associação com sua descrição funcional. Assim sendo, estes autores sugerem que a melhor forma de descrever um microbioma está na descrição robusta dos genes que o compõem e, por conseguinte, das funções que podem ser desempenhadas pela microbiota associada a determinado hospedeiro ou ambiente.

Dentro desta maior abrangência, apresenta-se o estudo do microbioma dos solos, amplamente desafiador, principalmente em função da grande diversidade nas formas de vida contidas neste ambiente e a heterogeneidade dos mesmos. A melhor compreensão deste componente apresenta-se como uma das bases para as futuras revoluções na agricultura e uso do solo. Um exemplo desta potencialidade está na atribuição da característica supressiva de solos a várias doenças de plantas (MENDES et al., 2011), sendo os microrganismos os agentes da inibição da ocorrência de doenças mesmo na presença dos patógenos (VAN ELSAS et al., 2012). Apesar dos enormes avanços obtidos por meio da inovação tecnológica relacionada ao acesso da informação microbiológica, ainda não existe um método robusto o bastante para acessar, de forma completa, o microbioma presente em um solo (VOGEL et al., 2009). Soma-se a esta grande diversidade do sistema solo a necessidade de metodologias que indiquem de forma sólida as alterações que ocorrem na escala temporal, o que ainda é bastante limitado devido ao custo de análise e cobertura amostral desejada.

Sabe-se que os solos apresentam uma estruturação das comunidades microbianas com determinada similaridade se analisados em um elevado nível taxonômico (TRINGE et al., 2005; JANSSEN, 2006; PHILIPPOT et al., 2013), ou seja, composta de um core microbiano encontrado na grande maioria dos solos. Este core é mais facilmente definido para a comunidade bacteriana do solo, composto principalmente pelos filos Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia, Bacteroidetes, Firmicutes e Planctomycetes (JANSSEN, 2006). Este core é relativamente estável dentro do conceito taxonômico da comunidade microbiana, mas pode ser distinto em relação às funções desempenhadas pelos organismos que o compõem. Assim, organismos taxonomicamente similares podem ter funções distintas, de acordo com o ambiente onde se encontram e desenvolvem. Verifica-se, pois, que o conceito de microbioma deve ser melhor aplicado aos solos, o que é proposto pela iniciativa chamada de Terragenoma (<http://www.terragenome.org/>) (VOGEL et al., 2009), a qual tem como objetivos organizar as informações geradas sobre o microbioma dos solos, e realizar a completa descrição do material genético microbiano contido em um grama de solo. Com isto, espera-se estabelecer parâmetros e entender melhor as interações microbianas que regem este ecossistema.

Em relação aos solos brasileiros, este tipo de estudo se faz necessário, uma vez que é sobre tais solos e seus respectivos microbiomas que se sustentam biomas de grande biodiversidade, ou mesmo áreas de cultivo agrícola com elevada produtividade e importância econômica. Pode-se ainda extrapolar o conceito de microbioma, considerando-o não apenas como o conjunto de organismos presentes em uma área distinta, mas associado aos diferentes solos sobre os quais se desenvolve a mesma cultura agrícola, ou que integram a mesma paisagem, inserindo assim o conceito de biogeografia na definição de microbioma (FIERER et al., 2006; MARTINY et al., 2006).

No Brasil, uma iniciativa originou o grupo denominado Brazilian Microbiome Project (BMP) (<http://www.brmicrobiome.org/>), que visa descrever os microbiomas associados aos diversos ambientes brasileiros. Este grupo publicou seu primeiro trabalho, em que é apresentada uma revisão detalhada dos estudos desenvolvidos com esta finalidade nos mais diferentes ambientes brasileiros (PYLRO et al., 2014), dentre os quais destacam-se os solos explorados em diferentes áreas do território nacional. Os membros componentes desta iniciativa estão atuando de forma colaborativa com uma iniciativa mundial do chamado Earth Microbiome (<http://www.earthmicrobiome.org/>), o qual deve facilitar a inserção dos

dados sobre os biomas brasileiros em um cenário mundial, onde estes poderão ser comparados a outros ambientes, dando base à comparação e elucidação da elevada biodiversidade brasileira, também no tocante às comunidades microbianas.

1.4. Serviços Ecosistêmicos da Biodiversidade Microbiana dos Solos

Toda esta exploração da biodiversidade do solo não só faz sentido para que tenhamos conhecimento sobre o tema, ou para que seja possível utilizar seus recursos biotecnológicos. A preservação deste recurso é de extrema importância em todos os solos, onde é pouco conhecida a importância da microbiologia na preservação de sua funcionalidade. Em áreas naturais, a microbiota dos solos é de extrema importância na ciclagem de nutrientes e na sustentação do ecossistema, atuando na base da cadeia alimentar que permeia estes ambientes. Em áreas agrícolas, esta microbiota tem grande importância, atuando como base de seleção para as plantas, e atuando de forma significativa contra a invasão dos solos por organismos exógenos. A importância da biodiversidade na resistência do solo e a entrada de novos organismos foi demonstrada de forma elegante por Van Elsas et al. (2012), onde os autores verificaram que a sobrevivência de um patógeno humano, inoculado ao solo, é inversamente proporcional à biodiversidade microbiana do mesmo.

Numa visão global deste conceito, a diversidade microbiana dos solos é responsável pelos chamados serviços ecosistêmicos, caracterizados pelo conjunto de funções do ecossistema e dos recursos biotecnológicos supridos de forma determinante pela microbiota. Dentre estes, enumeram-se características essenciais ao solo, como a pedogênese, ciclagem do nitrogênio, transformação da matéria orgânica; até processos biotecnológicos, como a utilização da microbiota como alimento, promotora da biorremediação e do biocontrole, ou como promotora de processos de polinização (PIMENTEL et al., 1997). Este é um tema ainda pouco explorado com os recursos mais modernos de acesso à microbiota do solo, e portanto, bastante promissor na elevação da importância deste componente para o funcionamento de todo o sistema.

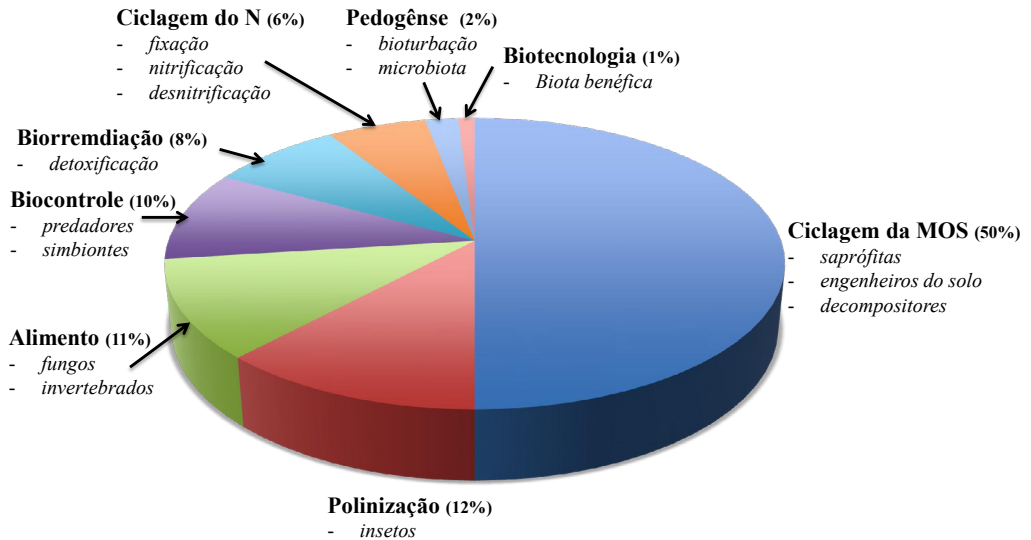


Figura 1.1 - Valoração dos serviços ecossistêmicos desempenhados pela diversidade microbiana dos solos. As percentagens entre parênteses indicam a contribuição de cada um desses serviços ecossistêmicos. Fonte: Pimentel et al. (1997)

1.5. Considerações Finais

A exuberância da biodiversidade brasileira se sustenta sobre uma outra biodiversidade, que atua na ciclagem dos elementos químicos e que sustenta o desenvolvimento vegetal (e por conseguinte animal) nos diferentes biomas brasileiros. Conhecer os organismos responsáveis por estes processos é por si só um desafio, e fazer uso deste recurso natural onipresente soa ainda utópico num cenário de alta competitividade do cenário agrícola mundial. Uma visão mais tecnológica dos processos pode ser vislumbrada na comparação entre os componentes taxonômicos e funcionais que ocorrem em solos sob distintos estados de conservação, ou ainda, sob diferentes condições de contaminação ambiental. Uma possibilidade neste sentido seria a indicação de manejos agrícolas que favoreçam o incremento de grupos ou de funções microbianas benéficas relacionadas ao incremento no desenvolvimento vegetal.

No entanto, apesar de todos os avanços apresentados no estudo de comunidades microbianas, ainda podem ser enumeradas limitações e desafios nesta área de pesquisa. Um destes pontos é a relação entre a taxonomia e a funcionalidade microbiana, o que ganha grande importância em ambientes como o solo, que apresentam comunidades microbianas com grande redundância funcional, ao mesmo tempo em que alguns de seus organismos são providos de grande plasticidade genômica. Talvez o que explique este tipo de processo, e componha o maior dos desafios no avanço dos estudos de ecologia microbiana, seja um fator intrínseco às características dos organismos componentes destas comunidades. Tanto a organização genômica, como a regência metabólica destes organismos são por vezes vistas pelos pesquisadores como similares àquelas encontradas em animais e plantas, mas possivelmente do ponto de vista evolutivo, estas sejam estruturas bastante distintas dos mesmos.

Portanto, este momento do desenvolvimento científico no estudo de comunidades microbianas nos solos é de extrema riqueza, em que as metodologias se apresentam em pleno desenvolvimento, gerando um cenário de *'tudo é possível'*, o que dá base à grande evolução no desenvolvimento científico, mas também engrandece a capacidade do pesquisador, sobrepujando a capacidade do mesmo de ser criativo e fazer aos seus conjuntos de dados os devidos questionamentos. Vale ainda um paralelo, onde tanto em situações de limitações tecnológicas, como na abundância das mesmas, a ciência dá seus maiores passos por meio de ideias inovadoras e visões holísticas processuais, as quais são, por enquanto, apenas passíveis de serem realizadas no cérebro humano.

Referências

ADESEMOYE, A.O.; KLOEPPER, J.W. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v. 85, p. 1-12, 2009.

BALDANI, J.I. et al. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 911-922, 1997.

BARTZ, M.L.C.; PASINI, A.; BROWN, G.G. Earthworms as soil quality indicators in Brazilian no-tillage systems. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 69, p. 39– 48, 2013.

BOON, E. et al. Interactions in the microbiome: communities of organisms and communities of genes. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 38, p. 90–118, 2014.

BRADY, N.C.; WEIL, R.R. **Elementos da natureza e propriedades dos solos**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 716 p.

CAMARA, R.; CORREIA, M.E.F.; VILLELA, D.M. Effects of eucalyptus plantations on soil arthropod communities in a Brazilian Atlantic forest conservation unit. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 3, p. 445-455, 2012.

CHAGNON, P.L. et al. A trait-based framework to understand life history of mycorrhizal fungi. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 18, p. 484-491, 2013.

DIAS, A.C.F. et al. Abundance and genetic diversity of *nifH* gene sequences in anthropogenically affected Brazilian mangrove sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, p. 7960-7967, 2012.

FIERER, N.; JACKSON, R.B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America**, Washington, v. 103, n. 3, p. 626–631, 2006.

GILLER, P.S. The diversity of soil communities, the 'poor man's tropical rainforest'. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 5, p. 135-168, 1996.

GOMES, N.C.M. et al. Exploring the diversity of bacterial communities in sediments of urban mangrove forests. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 66, p. 96–109, 2008.

GORLACH-LIRA, K.; COUTINHO, H.D.M. Population dynamics and extracellular enzymes activity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from semi-arid soil of northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, p. 135-141, 2007.

THE HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**, New York, v. 486, p. 207–214, 2012.

JANSSEN, P.H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 1719–1728, 2006.

- JESUS, E.C. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **The ISME Journal**, New York, v. 3, p. 1004-1011, 2009.
- KAHINDI, J.H.P. et al. Agricultural intensification, soil biodiversity and ecosystem function in the tropics: the role of nitrogen fixing bacteria. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 6, p. 55-76, 1997.
- KAVAMURA, V.N. et al. Water regime influences bulk soil and rhizosphere of *Cereus jamacaru* bacterial communities in the Brazilian caatinga biome. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, p. e73606, 2013.
- KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.M. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 4., 1978, Angers. **Proceedings...** Angers, 1978. p. 879-882.
- LAMBAIS, M.R. et al. Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic forest. **Science**, New York, v. 312, p. 1917-1917, 2006.
- LEDERBERG, J.; MCCRAY, A.T. 'Ome Sweet 'Omics: a genealogical treasury of words. **Scientist**, Philadelphia, v. 15, p. 8, 2001.
- LUPATINI, M. et al. Soil-borne bacterial structure and diversity does not reflect community activity in Pampa biome. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 10, p. e76465, 2013.
- MARTINY, J.B.H. et al. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. **Nature Reviews in Microbiology**, New York, v.4, n. 2, p. 102-112, 2006.
- MENDES, L.W. et al. Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere. **The ISME Journal**, New York, v. 8, p. 1577-1587, 2014.
- MENDES, R. et al. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. **Science**, New York, v. 332, p. 1097-1100, 2011.
- MIRANSARI, M. Soil microbes and the availability of soil nutrients. **Acta Physiologiae Plantarum**, Paris, v. 35, p. 3075-3084, 2013.
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Ed. UFLA, 2006. 626 p.

MOREIRA, M. et al. Biodiversity and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi in Araucaria forest. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, p. 393-399, 2007.

NICHOLSON, J.K. et al. Host-gut microbiota metabolic interactions. **Science**, New York, v. 336, p. 1262-1267, 2012.

PHILIPPOT, L. et al. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**, New York, v. 11, p. 789-799, 2013.

PIMENTEL, D. et al. Economic and environmental benefits of biodiversity. **BioScience**, Washington, v. 47, p. 747-757, 1997.

PYLRO, V.S. et al. Brazilian Microbiome Project: revealing the unexplored microbial diversity challenges and prospects. **Microbial Ecology**, New York, v. 67, p. 237-241, 2014.

RAYMOND, J. et al. The natural history of nitrogen fixation. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 21, p. 541-554, 2004.

RIBEIRO, M.R.; CARDOSO, E.J.B.N. Isolation, selection and characterization of root-associated growth promoting bacteria in Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*). **Microbiological Research**, Jena, v. 67, n. 2, p. 69-78, 2012.

RODRIGUES, J.L.M. et al. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America**, New York, v. 110, p. 988-993, 2013.

SANTOS, E.C. et al. Artificial neural network modeling of microbial community structures in the Atlantic Forest of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 69, p. 101-109, 2014.

SIQUEIRA, J.O. et al. (Org.). **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**. Lavras: Ed. UFLA, 2010, 716 p.

TRINGE, S.G. et al. Comparative metagenomics of microbial communities. **Science**, New York, v. 308, n. 5721, p. 554-557, 2005.

TURNBAUGH, P.J. et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, New York, v. 444, p.1027-103, 2006.

VAN ELSAS, J.D. et al. Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America**, New York, v. 109, n. 4, p. 1159-1164, 2012.

VARON-LOPEZ, M. et al. Sulphur-oxidizing and sulphate-reducing communities in Brazilian mangrove sediments. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 16, p. 845-855, 2014.

VASCONCELLOS, R.L.F.; CARDOSO, E.J.B.N. Rhizospheric streptomycetes as potential biocontrol agents of *Fusarium* and *Armillaria* pine rot and as PGPR for *Pinus taeda*. **Biocontrol**, Dordrecht, v. 54, p. 807–816, 2009.

VOGEL, T.M. TerraGenome: a consortium for the sequencing of a soil metagenome. **Nature**, New York, v. 7, p. 252, 2009.

CAPÍTULO 2

O SOLO COMO AMBIENTE PARA A VIDA MICROBIANA

Simone Raposo Cotta

2.1. Introdução

O solo é um dos principais compartimentos da biosfera em termos de reservatório biológico, além de funcionar como um importante reservatório de água, suporte essencial do sistema agrícola e atividades humanas. Neste capítulo serão abordados tópicos que contribuem para uma melhor compreensão do solo, sua importância, estrutura, diversidade biológica e os fatores determinantes dessa diversidade.

O solo é um sistema biológico dinâmico, considerado o principal reservatório da diversidade biológica, onde podemos observar uma malha estreita de inter-relações dos organismos presentes, sendo essa malha essencial para a manutenção do equilíbrio ecológico, como por exemplo, na manutenção da ciclagem de nutrientes neste ambiente bastante complexo que apresenta peculiaridades que o tornam um sistema único na biosfera (RAAIJMAKERS et al., 2009; BERENDSEN et al., 2012).

O solo encontra-se estruturado de maneira heterogênea e descontínua, o que possibilita a ocorrência de micro-habitats que irão variar entre si em função das suas características físicas e químicas e da disponibilidade de nutrientes, sendo essa variação também em função do tempo e do espaço. Além disso, a formação dos micro-habitats encontra-se associada com a formação de agregados de solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2009; DUCHICELA et al., 2013). Os agregados são formados por diferentes proporções de areia, argila e silte, que funcionam como um suporte físico para a aderência microbiana e proporcionam condições diferenciadas de aeração e disponibilidade de nutrientes que possibilitam a coexistência de milhares de microrganismos, com diferenciadas habilidades metabólicas, nessas regiões (Figura 2.1) (DUCHIELA et al., 2013).

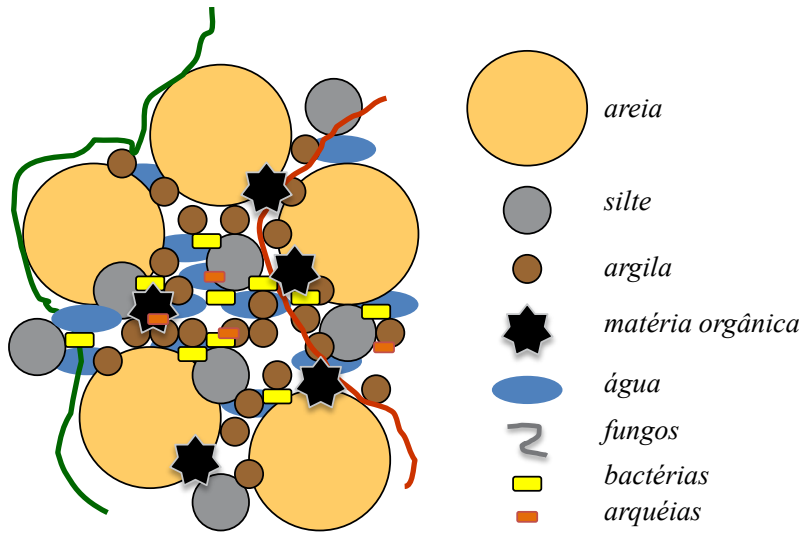


Figura 2.1 - Esquema da estrutura, composição e organização de um agregado de solo.

A presença de grupos microbianos específicos em cada um dos micro-habitats do solo é tanto causa como consequência das características particulares de cada uma destas micro-regiões. Alguns dos mecanismos de interação entre os microrganismos e as partículas do solo já foram descritos, sendo um dos principais, a produção de polissacarídeos extracelulares, comumente de origem bacteriana, que interagem com as partículas de argila, promovendo a adesão das células microbianas às partículas de solo (HONG et al., 2013). Outra substância com esta mesma propriedade, porém produzida por fungos micorrízicos arbusculares é a glomalina, que é uma glicoproteína que atua na adesão das partículas dos agregados do solo entre si e constitui uma forma de sequestro de carbono (VASCONCELLOS et al., 2013).

A heterogeneidade do solo também se dá em relação à disponibilidade de nutrientes. De maneira geral, o solo é um ambiente caracterizado pela oligotrofia (baixa disponibilidade de nutrientes), mas apresenta a ocorrência de "hot spots", que são zonas que possuem uma elevada atividade biológica devido à presença de fontes nutricionais biodisponíveis (MOREIRA & SIQUEIRA 2009). Alguns exemplos de "hot spot" do solo são zonas de acúmulo de matéria orgânica e as frações do solo mais próximas à raiz das plantas, conhecidas como rizosfera (região do

solo que sofre intensa influência da exsudação radicular). É nesses "hot spots" que a maior parte da vida se desenvolve no solo. Há presença de formas de vida em toda extensão do solo, porém é nessas áreas que os seres vivos se tornam mais abundantes e ativos (PHILIPPOT et al., 2013).

2.2. A vida abundante e diversa nos solos

Apesar de ser um ambiente oligotrófico, o solo é um ambiente que hospeda uma grande quantidade de vida. A abundância média de vida nos solos varia entre 10^7 a 10^9 células vivas por grama de solo (ALEXANDER, 1977). A diversidade microbiana dos diferentes tipos de solo é também bastante extensa. Torsvik e colaboradores (2009) estimaram em aproximadamente 10.000 o número de espécies bacterianas por grama de solo.

A ocorrência dessa abundância e diversidade é vital para a funcionalidade do solo, pois diferentes organismos possuem diferentes características fisiológicas e ecológicas, garantindo, assim, a ocorrência dos mais diferentes processos dos solos frente às variações ambientais (BEVER et al., 2012). A perda ou a redução dessa diversidade compromete a funcionalidade do solo.

Interações entre a comunidade microbiana e o ambiente que habitam (propriedades químicas, gradiente de oxigênio, entre outros) não afetam significativamente apenas a estruturação das comunidades microbianas, mas também regulam muitas das funções do solo realizadas pelos microrganismos, como decomposição da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes, o controle biológico de pragas através da produção de compostos com atividade antimicrobiana, a transformação de metais e minerais, a decomposição, degradação de xenobiontes e compostos fenólicos, além de contribuírem para a formação e sedimentação dos solos (CARDOSO et al., 1992; JUAREZ et al., 2013).

A elevada heterogeneidade dos solos (entre diferentes solos e dentro do mesmo solo) permite a ocorrência de diferentes habitats que irão influenciar diretamente na diversidade e abundância dos microrganismos que nele habitam (VOS et al., 2013).

2.3. Fatores que regem a diversidade microbiana dos solos

A diversidade microbiana encontra-se diretamente relacionada com um conjunto de fatores abióticos (atmosfera, temperatura, água, pH, potencial redox, fontes nutricionais, entre outros) e bióticos (genética microbiana, a interação entre os microrganismos, entre outros) que permitem o desenvolvimento microbiano e a estruturação da comunidade viva dos solos. A interação entre esses fatores influencia diretamente a ecologia, a atividade e a dinâmica populacional de microrganismos no solo (MOREIRA; SIQUEIRA 2009). Nos próximos tópicos serão abordados os principais fatores determinantes da diversidade microbiana nos solos.

2.3.1. Atmosfera

A atmosfera do solo compreende a porcentagem, composição e disponibilização dos gases que serão utilizados pelo metabolismo microbiano, sendo o principal gás o oxigênio. A taxa de difusão e a concentração de oxigênio no solo são variáveis, possibilitando a ocorrência de diferentes ambientes (anaeróbio, microaeróbio e anaeróbio) (CARDOSO et al., 1992).

Os ambientes aeróbios (com até 20% de O_2) apresentam elevadas concentrações de oxigênio, propiciando a ocorrência de metabolismos oxidativos, onde o oxigênio é utilizado como aceptor final de elétrons na respiração. Quando a concentração de oxigênio se encontra muito baixa, os ambientes são descritos como microaerofílicos. Organismos que se multiplicam nessas condições são capazes de utilizar oxigênio e outros elementos como aceptores finais de elétrons. Os ambientes anaeróbicos são caracterizados pela ausência do oxigênio, onde serão utilizados outros elementos como aceptores finais de elétrons em seu metabolismo. Os solos alagados (cultivo de arroz, manguezais, entre outros) são solos tipicamente anaeróbios. Porém, é possível observar a ocorrência da anaerobiose nos diferentes microhabitats do solo, mesmo naqueles predominantemente aeróbios, devido à ocorrência da intensa atividade respiratória dos organismos aeróbios ou em regiões que apresentam alta viscosidade. Nessas condições, além da ausência de oxigênio, frequentemente a atmosfera do solo possui valores muito elevados de gás carbônico, podendo chegar até por volta de 5%, centenas de vezes mais do que na atmosfera terrestre externa (0,04%). Os procaríotos são os únicos organismos que conseguem sobreviver em condições de anaerobiose (MADIGAN et al., 2010; CARDOSO et al., 1992).

2.3.2. Temperatura

A atividade das células dos organismos é governada pelas leis da termodinâmica, onde a temperatura influencia diretamente (acelerando ou retardando) a ocorrência dos processos metabólicos microbianos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2009).

Cada microrganismo possui um valor ótimo de temperatura para a sua multiplicação e desenvolvimento, sendo esse valor dependente do aporte enzimático apresentado pelo organismo. Dependendo da faixa ótima de temperatura para o seu crescimento e atividade, os microrganismos podem ser divididos em psicrófilos (menos que 20°C); mesófilos (entre 20 e 40°C) e termófilos (mais que 40°C). Apenas alguns procaríotos crescem em temperaturas acima de 60°C, que são os hipertermófilos (Figura 2.2) (MADIGAN et al., 2010).

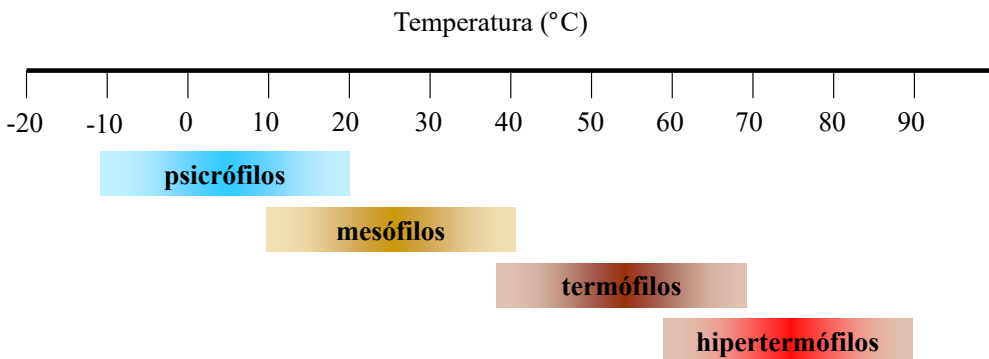


Figura 2.2 - Classificação dos microrganismos do solo de acordo com a temperatura ótima para multiplicação celular.

O crescimento otimizado em diferentes temperaturas deve-se ao fato de que esses organismos possuem adaptações que possibilitam o seu desenvolvimento como, por exemplo, mudanças conformacionais nas proteínas, grau de saturação dos ácidos graxos presentes na membrana, e outros (VERMELHO et al., 2007).

As características físicas e químicas do solo (densidade do solo, potencial de óxido-redução, pressão, difusão de gases, viscosidade, tensão superficial etc.) também sofrem influência direta da temperatura. As modificações desses padrões do solo em função da temperatura podem também levar a uma modificação no ambiente microbiano, que, portanto, afeta a funcionalidade do sistema, alterando a velocidade das reações como degradação da matéria orgânica e oxidação da amônia (MOREIRA; SIQUEIRA, 2009).

2.3.3. Água

Elemento essencial para a ocorrência e a manutenção da vida do planeta, a água é o principal solvente da natureza, no qual se encontra diluída grande parte dos nutrientes e onde ocorrem as principais reações bioquímicas no meio intracelular. Nos solos, a água pode ser encontrada em três formas distintas: água higroscópica, que se encontra aderida às partículas do solo, água capilar, que corresponde ao reservatório contido nos microporos e água livre ou gravitacional, que escoar pelos macroporos, sendo que, na capacidade de campo, a água é retida por uma força de 1/3 de atmosfera (MOREIRA; SIQUEIRA, 2009).

A água influencia diretamente a atividade biológica dos solos, participando na difusão de nutrientes, na motilidade microbiana, influenciando a determinação dos valores de pH e do potencial redox, além de estar relacionada com a temperatura e a aeração.

As variações sazonais de temperatura e umidade implicam na ocorrência de ciclos de seca/umidade (em alguns casos congelamento e aquecimento) que ajudam a liberar substratos das superfícies das argilas ou de células mortas, estimulando a atividade metabólica dos solos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2009).

2.3.4. pH

O pH é um dos atributos físico-químicos do solo mais descritos por influenciar as diferentes comunidades microbianas que habitam os solos. Os mecanismos exatos de como esse parâmetro influencia as comunidades microbianas ainda não são bem descritos, mas sabe-se que os valores de pH afetam a solubilidade dos minerais no solo, afetando, portanto, a disponibilidade de nutrientes. Ferro, manganês e zinco são menos

disponíveis em valores de pH acima de 7,0. Ferro, alumínio e manganês atingem níveis tóxicos em valores de pH menores que 5,0 e estão menos disponíveis em valores altos ou baixos. Práticas agrícolas e formas de manejo são realizadas com o objetivo de minimizar os efeitos deletérios e estimular os efeitos positivos das variações de pH (Figura 2.3) (MOREIRA; SIQUEIRA, 2009).

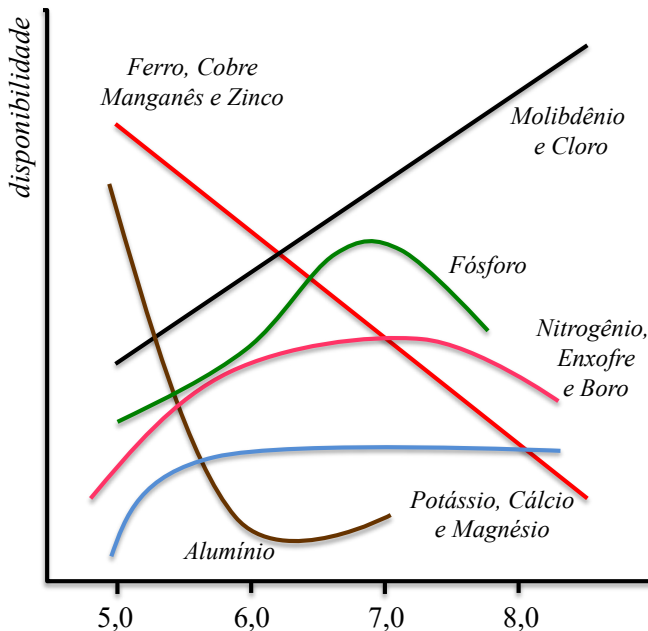


Figura 2.3 - Disponibilidade de nutrientes em diferentes valores de pH do solo.

Esses valores também podem ser influenciados pela atividade metabólica microbiana. Adições de carboidratos diminuem inicialmente os valores de pH pela produção de metabólitos ácidos e de CO_2 provenientes do metabolismo microbiano (BÅÅTH et al., 1995).

A diversidade e a funcionalidade microbiana dos solos é descrita como fortemente relacionada aos valores de pH. As comunidades microbianas que oxidam amônia (primeira e fundamental etapa na nitrificação; veja capítulo 7) são diretamente influenciadas pelo pH.

Nos solos em que são observados valores de pH baixos (<5.5) há uma predominância de arqueias que oxidam amônia e em solos onde o

pH é um pouco mais elevado (> 5.5), há uma predominância de bactérias que oxidam amônia. Esse fenômeno é conhecido como especificidade de nicho e ainda não se compreendem plenamente os mecanismos envolvidos na ocorrência desse fenômeno (PROSSER; NICOL, 2012).

Além disso, da mesma maneira que a temperatura, os valores de pH influenciam a atividade dos complexos enzimáticos microbianos, permitindo a classificação dos microrganismos em acidófilos, neutrófilos ou basófilos de acordo com o pH ótimo de atuação de suas enzimas. Os microrganismos acidófilos são os que preferem valores de pH baixos (ácidos); neutrófilos preferem valores de pH mais próximos da neutralidade e os basófilos preferem valores de pH mais elevados (básicos) (VERMELHO et al., 2007).

2.3.5. Potencial redox

As reações de óxido-redução são vitais para a manutenção da vida no planeta. A ocorrência dessas reações é acessada pela medida do potencial redox (Eh, expresso em volts). O potencial redox é a medida de tendência do ambiente em ganhar ou ceder elétrons (MADIGAN et al., 2010), mas em solos, a determinação deste valor serve como um indicativo bioquímico do processo metabólico predominante neste solo.

Seres vivos obtêm energia a partir da oxidação dos materiais reduzidos, removendo elétrons de substâncias inorgânicas e orgânicas para capturar a energia disponível. Esse parâmetro pode variar entre micro e macro-habitats e é afetado por pH, temperatura, pressão e composição atmosférica e, indiretamente, pelo nível de substratos disponíveis (MOREIRA; SIQUEIRA, 2009).

Nos valores de voltagem positiva (Eh) tendem a ocorrer reações nas quais compostos energéticos perdem elétrons (ambiente oxidado) para transferi-los a compostos eletro-negativos, os quais atuam como aceptores finais de elétrons, propiciando a ocorrência de metabolismos respiratórios e processos de aerobiose facultativa, com geração de energia. Essa condição é normalmente encontrada em locais aerados, como na maioria dos solos agricultáveis. Nos valores de Eh negativos ocorre a tendência de doar elétrons (ambiente reduzido) propiciando a ocorrência de metabolismos anaeróbios, favorecendo processos como redução de sulfato e metanogênese, que dão origem a menores quantidade de energia. Essas condições são encontradas em locais anaeróbios, solos

lodosos ou solos inundados (cultivo de arroz), entre outros (MADIGAN et al., 2010).

A sucessão de espécies microbianas em um determinado ambiente ocorre muitas vezes em função dos valores do potencial redox (Eh). À medida que o Eh diminui, ocorre uma transição da predominância de aeróbios para facultativos e, em seguida, anaeróbios (MOREIRA; SIQUEIRA, 2009).

Uma correlação mais detalhada entre o potencial redox dos solos e o metabolismo microbiano encontrado no mesmo será apresentada no capítulo 5.

2.3.6. Fontes nutricionais

O solo é considerado um dos principais reservatórios nutricionais do planeta, pois armazena constituintes essenciais ao metabolismo e conseqüente multiplicação de células dos organismos vivos, como carbono e nitrogênio, além dos nutrientes minerais, como P, K, Ca, Mg, S, Fe, Zn, Mn, Cu, Mo, Co, Na, Cr, Ni, Se, W e V, enquanto as moléculas dos constituintes gasosos, como oxigênio e nitrogênio, fazem parte da atmosfera livre e do solo. A maioria desses elementos faz parte das principais moléculas orgânicas e estes são essenciais para a ocorrência dos metabolismos quimiolitotrófico e fotoautotrófico. Além disso, por meio dos processos biogeoquímicos, resultantes das interações com os organismos do solo, esses nutrientes estão em constante renovação no solo, promovendo a manutenção da vida (CARDOSO et al., 1992; MOREIRA; SIQUEIRA, 2009; MADIGAN et al., 2010).

Os organismos do solo apresentam uma grande diversidade na capacidade de utilizar diferentes fontes de nutrientes para sua multiplicação (ver capítulo 5). No entanto, pode-se destacar dentre estas fontes, aquela desempenhada pela matéria orgânica do solo, que supre o metabolismo de uma grande gama de organismos do solo, sendo sua decomposição a base deste processo.

2.3.7. Matéria orgânica

A matéria orgânica do solo (MOS) é resultado da mistura de componentes de origem biológica (restos de decomposição em diferentes estádios evolutivos), microrganismos e materiais vegetais não decompostos,

além de compostos produzidos pelo homem conhecidos como xenobióticos (Figura 2.4.). A utilização dos xenobióticos pelo metabolismo microbiano e sua participação em processos de recuperação ambiental serão abordados em maiores detalhes no capítulo 13.

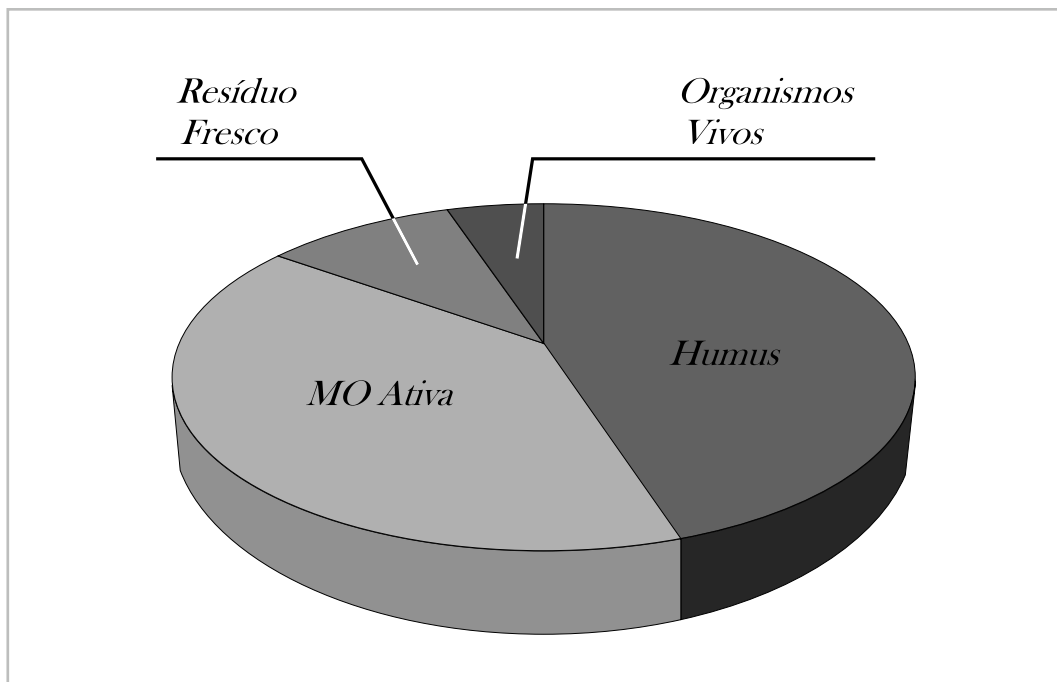


Figura 2.4 - Principais frações constituintes da matéria orgânica dos solos.

A distribuição da MOS não é uniforme e varia de acordo com a origem e as propriedades físicas, químicas e mineralógicas dos solos. A maior atividade biológica do solo situa-se, de modo geral, na camada de 0 a 20 cm de profundidade, pois aí ocorre maior acumulação da matéria orgânica do solo pela deposição de material vegetal da parte aérea, além do efeito das raízes. Assim, a matéria orgânica e o efeito rizosférico são função da cobertura vegetal do solo e têm influência direta sobre os microrganismos (RASCHE; CADISH, 2013).

Os compostos orgânicos e sua taxa de degradação pelos microrganismos dependerão do tipo de substrato, da relação espacial (acessíveis ou não em relação às células e/ou enzimas) e das condições físicas e químicas dos micro-habitats (MOREIRA; SIQUEIRA, 2009). Nem

toda substância orgânica é passível de degradação por microrganismos. Substâncias não degradáveis ou que demoram a ser degradadas são denominadas recalcitrantes e tanto podem ser produtos naturais (húmus, porfirinas e alguns D-aminoácidos) como xenobióticos (plásticos, detergentes e alguns pesticidas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2009). Dependendo da velocidade de ocorrência das reações no solo, a matéria orgânica pode ser facilmente reciclada, ou seja, é considerada de fácil degradação (correspondendo principalmente a carboidratos, aminoácidos e frações lipídicas). Outros componentes podem permanecer no solo por meses ou décadas (10-40%), por apresentarem maior recalcitrância ao processo de degradação (correspondendo à fração húmica), permanecendo no solo por séculos ou milênios (40-60%) (RASCHE; CADISH, 2013).

A matéria orgânica influencia as propriedades do solo, a disponibilidade de nutrientes para a multiplicação de células microbianas e das plantas, e regula a ciclagem do carbono e sua estabilização. Mudanças no status nutricional do solo, como a redução do conteúdo de matéria orgânica afeta a diversidade microbiana dos solos (RASCHE; CADISH, 2013).

2.4. Considerações Finais

Este capítulo tem a intenção de caracterizar o solo como um ambiente heterogêneo e dinâmico, onde se desenvolve uma comunidade viva composta de alta abundância de organismos e alta biodiversidade. Encontram-se neste ambiente representantes dos três domínios filogenéticos, sendo que estes têm suas atividades metabólicas e frequências moduladas pelas frequentes mudanças de condições do ambiente.

Esta caracterização faz com que a biodiversidade do solo se insira às características físicas e químicas deste ambiente, sendo também responsiva às práticas de manejo, e aos diferentes usos do solo. Neste contexto, serve como regra geral o fato de que a homogeneização do sistema, seja esta promovida por atividades antrópicas ou processos naturais, leva a uma restrição na diversidade de vida do solo. Por outro lado, o fato de este microbioma ser responsivo, pode sugerir que podemos manipulá-lo da melhor maneira possível, extraindo deste recurso, onipresente nos solos, funcionalidades novas que sustentem um mais eficiente sistema de produção vegetal.

2.5. Estudo de caso

Um agricultor adquiriu terras já com longo período de monocultivo com cana-de-açúcar. Ao estudar as possibilidades de uso destas terras, o mesmo foi alertado de que deveria melhorar a biodiversidade neste solo, uma vez que o mesmo deve ser muito restritivo neste conceito, por ter sua biodiversidade selecionada para o sistema cana nos últimos anos. Quais práticas de manejo podem ser aplicadas neste contexto, dando a este solo um ganho em biodiversidade? Utilize dados e tecnologias atuais para desenvolver esta questão.

Referências

ALEXANDER, M. **Introduction to soil microbiology**. 2nd ed. New York, John Wiley, 1977. 472 p.

BÅÅTH, E. et al. Microbial community structure and pH response in relation to soil organic matter quality in wood-ash fertilized, clear-cut or burned coniferous forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 27, p. 229-240, 1995.

BERENDSEN, R.L.; PIETERSE, C.M.J.; BAKKER, P.A.H.M. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.8, p.478-486, 2012.

BEVER, J.D.; PLATT, T.G.; MORTON, E. Microbial population and community dynamics on plant roots and their feedbacks on plant communities. **Annual Review in Microbiology**, New York, v. 66, p. 265-283, 2012.

CARDOSO, E.J.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. 360 p.

DUCHICELA, J. et al. Soil aggregate stability increase is strongly related to fungal community succession along an abandoned agricultural field chronosequence in the Bolivian Altiplano. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 50, p. 1266-1273, 2013.

HONG, Z. et al. The effect of extracellular polymeric substances on the adhesion of bacteria to clay minerals and goethite. **Chemical Geology**, Amsterdam, v. 306, p. 118-125, 2013.

JUÁREZ, M.F-D. et al. Wood ash effects on chemical and microbiological properties of digestate- and manure-amended soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 49, p. 575-585, 2013.

MADIGAN, M.T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2002. 625 p.

PHILIPPOT, L. et al. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.11, p.789-799, 2013.

PROSSER, J.I.; NICOL, G.W. Archaeal and bacterial ammonia oxidizers in soil: the quest for niche specialization and differentiation. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 20, p. 523-531, 2012.

RAAIJMAKERS, J.M. et al. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganism. **Plant and Soil**, Hague, v. 2, p. 341-361, 2009.

RASCHE, F.; CADISCH, G. The molecular microbial perspective of organic matter turnover and nutrient cycling in tropical agroecosystems. What do we know? **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 49, p. 251-262, 2013.

TORSVIK, V.; GOKSÖYR, J.; DAAE, F.L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied in Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, p. 782-787, 2009.

VASCONCELLOS, R.L.F. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and glomalin related soil protein (GRSP) as potential indicators of soil quality in a gradient of the Atlantic Forest in Brazil. **Land Degradation & Development**, v. 27, n. 2, p. 325-334, June 2013.

VERMELHO, A.B.; BASTOS, M.C.F.; SÁ, M.H.B. **Bacteriologia geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

VOS, M. et al. Micro-scale determinants of bacterial diversity in soil. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 37, p. 936-954, 2013.

CAPÍTULO 3

ECOLOGIA MICROBIANA

Elisa Rabelo Matos, Ademir Durrer, Fernando Dini Andreote

3.1. Introdução

A ecologia é o estudo das relações estabelecidas entre os organismos e dos organismos com o ambiente em que vivem. Neste capítulo serão abordados a definição do termo ecologia, o recente avanço nos estudos ecológicos de microrganismos, as interações por eles estabelecidas e como essas interações influenciam na ocupação, no estabelecimento e na manutenção dos microrganismos do solo.

Os estudos ecológicos tiveram início com o biólogo alemão Heinrich Haeckel, ainda no século XIX, que se baseava nas observações feitas por Darwin na tentativa de compreender a complexidade dos organismos através das variações em composição e distribuição das espécies e em função da sua localização e das suas interações com o ambiente.

Com o desenvolvimento dos estudos nessa área, este termo se tornou cada vez mais abrangente, preocupando-se com os mais diversos níveis de organização biológica, como: população (conjunto de indivíduos da mesma espécie), comunidade (conjunto de populações que vivem em um mesmo local e tempo), ecossistema (comunidade mais os fatores abióticos, como: temperatura, pH e outros), chegando aos biomas e, finalmente, à biosfera.

Dentro deste contexto, diversos são os temas que podem ser abordados, podendo-se destacar: estudos da distribuição e abundância da biodiversidade no espaço e tempo (biogeografia), as interações inter- e intraespecíficas com e suas respostas frente a alterações ambientais, os fatores ambientais que influem no desenvolvimento dos seres vivos, a compreensão de modelos comportamentais em animais e, mais

recentemente, o desenvolvimento de estudos ecológicos abrangendo os microrganismos.

Estudos ecológicos envolvendo os microrganismos são relativamente recentes, principalmente devido a algumas dificuldades encontradas para se determinar parâmetros ecológicos neste grupo de organismos. Na maior parte dos estudos, as teorias ecológicas que foram desenvolvidas a partir de observações nos macrorganismos são utilizadas para os estudos com microrganismos, sendo que na maioria das vezes o mesmo padrão de resposta é obtido, apesar de não se ter ainda a absoluta certeza de que os microrganismos respondem da mesma forma que os macrorganismos a todos os parâmetros ou estímulos.

Neste ponto, é importante destacar a importância da ecologia microbiana no desenvolvimento de aspectos teóricos de ecologia. Uma vez que as mesmas regras ecológicas sejam aplicadas tanto para macro como microrganismos, pode-se utilizar sistemas mais simples, com melhor controle das condições ambientais, e mais rápida resposta – devido ao curto ciclo vital dos microrganismos – para se desenvolver teorias ecológicas, que sejam posteriormente extrapoladas para macrorganismos. A única desvantagem neste ponto permanece na maior dificuldade de se monitorar espécies particulares de microrganismos quando inseridas em um contexto de alta diversidade microbiana.

As relações estabelecidas entre os microrganismos e dos mesmos com o ambiente em que vivem são fundamentais para a manutenção da vida e do equilíbrio do planeta. No solo, os microrganismos desempenham papel de destaque, visto que são uma das principais formas de vida neste ambiente. Dentre os efeitos benéficos, podem-se destacar aqueles relacionados com o estímulo ao desenvolvimento vegetal (e por consequência resultar em maior produtividade agrícola), sejam estes relacionados diretamente com a fisiologia da própria planta, ou indiretos, onde os microrganismos apresentam atividades – como a degradação de compostos orgânicos ou o antagonismo a patógenos – que interferem no desenvolvimento vegetal (ANDREOTE et al., 2014). Contudo, a comunidade microbiana também pode influir de forma negativa sobre a produtividade nos vegetais, competindo por nutrientes; promovendo a perda dos mesmos do solo, a partir da geração de formas móveis que podem ser lixiviadas ou, ainda, sendo causadores de diversas doenças. Devido a estas relevantes funções dos microrganismos no solo, a compreensão de suas relações ecológicas e de seus mecanismos de sobrevivência neste ambiente é fundamental para

predizer as consequências de futuras alterações ambientais, entender a sua importância para o funcionamento dos ecossistemas e também auxiliar a elevar de forma sustentável a produtividade nos campos agrícolas.

3.2. Interações microbianas

Devido à alta diversidade, número de espécies (riqueza) e abundância microbiana que podemos encontrar no solo, os microrganismos e os outros seres vivos presentes, como as plantas e a fauna, não sobrevivem de forma isolada, ou seja, não se desenvolvem independentemente um do outro. Na verdade, estes estão constantemente interagindo uns com os outros, o que é fundamental para se sobreviver num ambiente altamente variável, competitivo e oligotrófico (pobre em nutrientes) (CARDOSO et al., 1992; HALLAM; MCCUTCHEON, 2015). Didaticamente, estas interações ecológicas podem, primeiramente, ser divididas em dois grandes grupos. O primeiro é proveniente de interações *positivas* nas quais pelo menos um dos organismos envolvidos é beneficiado e nenhum deles é prejudicado. O segundo grupo pode ser chamado de interações *negativas* e ocorre quando pelo menos um dos organismos envolvidos é prejudicado, podendo ou não ocorrer benefícios para a outra parte envolvida (CARDOSO et al., 1992).

Dentre as **interações positivas** algumas desempenham papel de destaque para a complexidade do sistema biológico no solo, nas quais se destacam:

Relações Simbióticas Mutualísticas: neste tipo de interação os organismos se auxiliam numa relação mútua, sendo ambos beneficiados. Exemplos disso são a interação de microrganismos como bactérias diazotróficas ou os Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA) com as plantas, que resultam em ganho mútuo; auxiliando os vegetais na aquisição de nutrientes, e beneficiando os microrganismos, que recebem parte destes nutrientes das plantas num ambiente oligotrófico como o solo.

Comensalismo: Nessa interação apenas um organismo se beneficia, sendo essa relação positiva para o mesmo e neutra para o outro organismo envolvido na interação. Como exemplo, uma população microbiana produz alguns compostos, como vitaminas e/ou aminoácidos e estes são utilizados por outra população, como as plantas, em benefício próprio.

Já dentre as **interações negativas**, podem-se destacar:

Antagonismo: Nesta interação um organismo produz substâncias que podem inibir o crescimento de outro organismo, ou seja, bactérias podem produzir substâncias que impeçam o crescimento de outros microrganismos ou sejam tóxicas a ele. Como exemplos podemos citar o caso de um microrganismo que produz uma substância que acidifica o solo e, com isso, o torna inadequado para a sobrevivência de outro. Ou ainda, o mais tradicional exemplo é a produção de antibióticos (comumente por fungos), o que limita o desenvolvimento de determinados grupos bacterianos.

Predação: Neste processo um organismo consome o outro, atacando e digerindo a sua presa, sendo o exemplo mais claro o de protozoários que consomem bactérias do solo.

Parasitismo: Nesta interação, o parasita se beneficia do metabolismo de seu hospedeiro para obter a sua fonte de energia e sobreviver. O exemplo clássico desta interação é a relação entre patógenos e plantas, como ocorre com fungos patogênicos (*Phytophthora*, *Fusarium*) que invadem as plantas e obtêm a sua energia a partir delas. Esta interação também é denominada de simbiose antagônica.

Competição: Neste tipo de interação os organismos competem principalmente por nutrientes, sendo comum isto ocorrer entre os microrganismos e/ou entre plantas. Um exemplo deste tipo de interação é a adoção da recente prática agrícola de colheita crua, deixando a palha na lavoura, no cultivo de cana-de-açúcar. Esta palha, devido a sua elevada relação C/N (70/1 a 80/1) faz com que os microrganismos do solo a decomponham e a consumam como fonte de carbono. Contudo, devido à relação C/N média de 8/1 da microbiota do solo estes, ao consumirem o carbono proveniente da palha, também consumirão o nitrogênio do solo. Portanto, caso não exista reposição do mesmo no sistema, num primeiro momento, os microrganismos do solo irão competir com a planta pelo nitrogênio disponível e como consequência podem ocasionar um déficit do mesmo na cultura.

Apesar de cada uma das interações ter sido abordada de forma isolada, cabe ressaltar que uma população microbiana pode desempenhar mais de um tipo de interação ecológica com outras populações. Recentemente, van Elsas e colaboradores (2012) demonstraram que algumas espécies de bactérias interagem conjuntamente para competir e evitar a entrada de patógenos no solo. Mendes e colaboradores (2011)

identificaram bactérias associadas à supressão de doenças e constataram que este fenômeno não depende apenas da atuação de bactérias isoladas, mas da atividade conjunta de um consórcio de bactérias. Os dados obtidos por estes pesquisadores indicaram que, após a raiz da planta ser atacada por um agente patogênico, como um fungo por exemplo, as plantas podem recrutar – via ativação do metabolismo celular – os grupos microbianos que atuam na supressão do desenvolvimento do patógeno. As interações ecológicas existentes no solo, sejam elas positivas ou negativas, contribuem não apenas para a manutenção do equilíbrio biológico no sistema, mas também demonstram a complexidade deste ambiente.

3.3. Estrutura organizacional das comunidades microbianas do solo

Do ponto de vista organizacional, as comunidades microbianas do solo organizam-se em populações, definidas como um conjunto de organismos da mesma espécie, que se distribuem em diferentes frequências, dando origem a uma curva assintótica, que é padrão na descrição da estrutura das populações que existem em solos (figura 3.1).

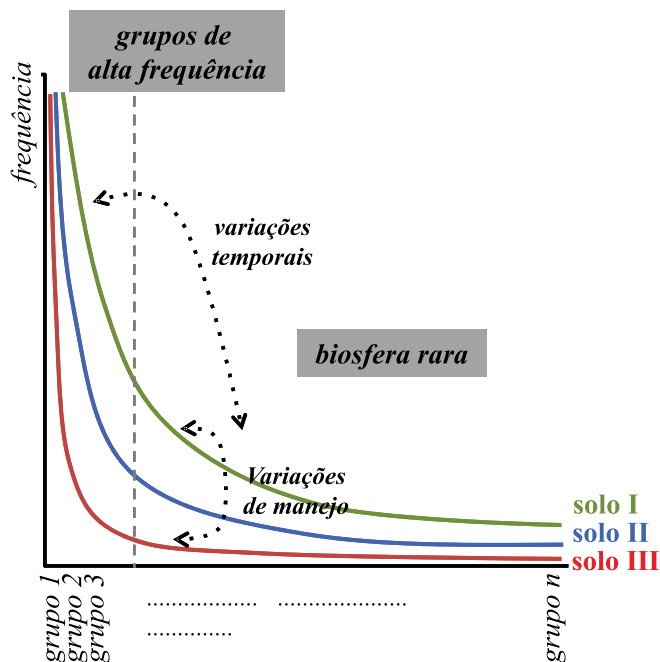


Figura 3.1 - Curvas de distribuição das frequências de populações encontradas em solos. Ver maiores explicações no texto.

Observando as curvas apresentadas na Figura 3.1, podemos verificar que um grupo pequeno de populações apresenta alta frequência em uma determinada amostra de solo, compondo o grupo de populações abundantes. Da mesma maneira, um grande número de populações apresenta frequências baixas nesta mesma amostra, dando origem à estrutura chamada de 'biosfera rara' (LYNCH; NEUFELD, 2015). Esta formação de dois grupos com estas características é comum a todos os solos, sendo o principal ponto de diferenciação entre estes o ângulo destas curvas. Por exemplo, solos com maiores valores de diversidade apresentam curvas assintóticas mais suaves, enquanto que solos com menor diversidade apresentam curvas descritas como '*L-shaped*' (Figura 3.1).

Este tipo de contemplação da diversidade biológica do solo é de extrema importância, dando a visão real de deformação da diversidade do solo frente a variações ambientais. Um primeiro efeito possível é causado por variações temporais nas condições ambientais, onde grupos componentes da biosfera rara podem vir a se tornar abundantes, e vice-versa. Este efeito não deforma a curva, mas apenas causa a troca de localização dos grupos no eixo x. A maior ou menor inclinação da curva, com alteração de suas proximidade aos eixos x e y, está relacionada a alterações específicas da diversidade do solo. Por exemplo, na Figura 3.1 pode-se perceber que o solo I apresenta maior diversidade do que o solo III, sendo uma diversidade intermediária encontrada no solo representado pela curva II (Figura 3.1). Traduzindo estes exemplos para situações reais, o solo I é possivelmente localizado em uma região de paisagem natural, como áreas de floresta primária. O solo III apresenta a curvatura característica de áreas de monocultura, com maior ênfase onde manejos conservacionistas não são empregados, levando a uma grande pressão de seleção e diminuição da diversidade deste ambiente. Por fim, o solo II traduz o comportamento da biodiversidade na maioria dos solos cultivados, sendo esta inferior à encontrada em áreas naturais, com este efeito suavizado por práticas conservacionistas, como a rotação de culturas, o plantio direto, e até mesmo a adubação biológica dos solos.

3.4. Aspectos ecológicos da sobrevivência microbiana nos solos

Uma vez apresentada a base ecológica dos organismos do solo, podemos relacionar estas características com a ocorrência dos grupos microbianos encontrados neste sistema. A regra básica de

sobrevivência dos organismos nos solos é a mesma que rege a ocorrência de macrorganismos em outros ecossistemas, a seleção natural. Descrita por Darwin como a causa principal da ocorrência de variação entre organismos, esta seleção atua sobre o conjunto de organismos vivos do solo que é determinada pela ação conjunta das características do solo, já apresentadas no capítulo 2.

As características de hospedagem de alta abundância de organismos, alta biodiversidade e heterogeneidade espacial e temporal dos solos, faz com que os organismos presentes neste ambiente apresentem algumas características ecológicas em comum. Uma destas características está na grande necessidade de interações biológicas que estes organismos apresentam para sua sobrevivência (VAN ELSAS et al., 2006). Esta estratégia parece vantajosa pois, uma vez que o metabolismo é dividido entre os componentes de uma interação benéfica, o metabolismo celular de cada componente da interação pode ser mais enxuto, dando a este organismo uma maior habilidade de se multiplicar com um menor gasto energético – característica importante num sistema oligotrófico.

Tomando em consideração todas as possibilidades de interações biológicas no sistema solo, pode-se sugerir que duas características principais estejam relacionadas à ocorrência de grupos microbianos neste ambiente, sendo estas a **Adaptação** e a **Competição** (HIBBING et al., 2010; HALLAM; MCCUTCHEON, 2015). Apesar de estes termos estarem parcialmente sobrepostos, existem metodologias específicas (não abordadas neste capítulo) que permitem determinar qual a predominância de um ou outro processo na estruturação da comunidade viva do solo alvo de estudo. Entretanto, ao estudar a microbiota do solo, também chama atenção a grande quantidade de casos em que ocorre colaboração entre diversos grupos, como em **simbioses, comensalismo e protocooperação**.

A Adaptação se refere à complementaridade entre as exigências metabólicas dos grupos microbianos e a condições ambientais encontradas em determinados solos. Por exemplo, a predominância de grupos microbianos aeróbios em solos com baixa umidade e com textura média ou arenosa; ou ainda a alta ocorrência de grupos microbianos acidófilos em solos florestais.

A Competição se refere à ocorrência de grupos que não possuem metabolismo complementar às condições ambientais, mas possuem grande capacidade de inibir o desenvolvimento de grupos que utilizariam este recurso natural para sua multiplicação. Características que levam a

este comportamento são relacionadas com a produção de antibióticos, entre outros, ou de agentes quelantes de nutrientes como, por exemplo, sideróforos.

Utilizando estes conceitos, pode-se sugerir que nos sistemas naturais, onde a microbiota co-evolui de forma mais íntima com os demais componentes do ecossistema, prevaleçam grupos adaptados em utilizar os recursos naturais, sendo assim menor a ocorrência de grupos que vivem neste ambiente com base na competição. No outro extremo temos os ambientes artificiais, em parte compostos por áreas de agricultura, onde a ocorrência de grupos competidores pode prevalecer, como por exemplo a entrada de organismos invasores, exógenos à área, e que apresentam alta taxa de multiplicação e estabelecimento neste novo nicho por serem altamente competitivos.

3.5. Características do solo

Algumas das características do solo e sua responsividade ao manejo estão ligadas às características **ecológicas** da comunidade viva que se hospeda neste ambiente. Compõe a base destas características a grande biodiversidade que ocorre no sistema, o que dá sustentação a uma alta diversidade metabólica, essencial para que as transformações necessárias para o funcionamento do sistema solo ocorram, mesmo quando as condições ambientais sejam alteradas. De forma a melhor esclarecer esta estruturação ecológica, alguns termos serão separadamente apresentados abaixo:

Diversidade biológica: diversidade de grupos taxonômicos que ocorrem em um solo. Esta é composta pela ocorrência de grupos de organismos distintos em microhábitats específicos do solo, sendo alterada drasticamente pela homogeneização do sistema (HORNBERGER-DEVINE et al., 2004).

Diversidade metabólica: termo derivado da diversidade biológica, mas abrange a diversidade de processos biológicos capazes de ser executados pela microbiota presente em determinado solo. Engloba tantos processos distintos como a ocorrência de grupos diferentes, capazes de executar transformações específicas sob diferentes condições ambientais.

Redundância Funcional: este termo deriva da diversidade metabólica, mas se refere especificamente a ocorrência de

funções similares em grupos microbianos funcionais sob distintas condições ambientais (JURBURG; SALLES, 2015). A alta redundância funcional é característica marcante do solo, sendo esta a base da manutenção do funcionamento do sistema heterogêneo e dinâmico encontrado nos mais diferentes solos.

Resiliência: a resiliência é o termo usado para descrever a capacidade do sistema retornar ao estado original após um impacto. Quando utilizado na biologia do solo, este termo indica a capacidade de a comunidade de organismos do solo retomar seu estado original, taxonômica e funcionalmente, após um impacto ambiental, seja este causado por um evento natural ou por atividades relacionadas ao manejo dos solos.

Tomados em conjunto, estes conceitos respondem pelo que chamamos de qualidade do solo, ou seja, a manutenção do funcionamento do sistema biológico que permeia o solo frente a alterações em seu uso, eliminando assim efeitos deletérios de seu manejo.

3.6. Estudo de Caso

A ecologia microbiana dos solos o caracteriza e é capaz de indicar alterações na fração viva do solo frente ao seu diferente uso. Trabalhos recentes tratam deste assunto, como por exemplo, o desenvolvido por Paula et al. (2014), em que os autores comparam a diversidade metabólica em solos da floresta Amazônica com aquela encontrada em áreas adjacentes de pastagem e também de floresta secundária. Resumidamente, os autores concluem que a diversidade metabólica na área de pastagem é menor, mas há uma maior semelhança na diversidade metabólica entre as áreas de florestas (primárias e secundárias). Como você explica estes resultados? Quais as características da ecologia do solo que levam a este evento?

Referências

ANDREOTE, F.D.; GUMIERE, T.; DURRER, A. Exploring interactions of plant microbiomes. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 71, n. 6, p. 528-539, 2014.

CARDOSO, E.J.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. 360 p.

HALLAM, S.J.; MCCUTCHEON, J.P. Microbes don't play solitaire: how cooperation trumps isolation in the microbial world. **Environmental Microbiology Reports**, Oxford, v. 7, n. 1, p. 26–28, 2015.

HIBBING, M.E. et al. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 8, n. 1, p. 15–25, 2010.

HORNER-DEVINE, M.C.; CARNEY, K.; BOHANNAN, B.J.M.. An ecological perspective on bacterial biodiversity. **Proceedings of the Royal Society. Series B**, Edinburgh, v. 271, p. 113-122, 2004.

JURBURG, S.D.; SALLES, J.F. Functional redundancy and ecosystem function: the soil microbiota as a case study. In: YUEH-HSIN LO; BLANCO, J.A.; ROY, S. (Ed.). **Biodiversity in ecosystems: linking structure and function**. InTech, 2015. chap. 2, p. 29-49.

LYNCH, M.D.J.; NEUFELD, J.D. Ecology and exploration of the rare biosphere. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.13, p.217–229, 2015.

MENDES, R. et al. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. **Science**, New York, v.332, p.1097–1100, 2011.

PAULA, F.S. et al. Land use change alters functional gene diversity, composition and abundance in Amazon forest soil microbial communities. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 23, n. 12, p. 2988–2999, 2014.

VAN ELSAS, J.D. et al. The bacteria and archaea in soil. In: VAN ELSAS, J.D.; JANSSON, J.K.; TREVORS, J.T. **Modern soil microbiology**. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2006. chap. 4, p. 83-106.

_____. Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, New York, v. 109, p. 1159–1164, 2012.

CAPÍTULO 4

RIZOSFERA

Emiliana Manesco Romagnoli, Fernando Dini Andreote

4.1. Introdução

Em 1904, o agrônomo alemão e fisiologista de plantas Lorenz Hiltner foi o primeiro autor a utilizar o termo "rizosfera" para descrever a interface da raiz da planta com o solo (HILTNER, 1904). Hiltner descreveu a rizosfera como uma área em torno da raiz da planta habitada por uma comunidade microbiana que é influenciada por compostos químicos liberados pela raiz da planta. Além disso, Hiltner previu que bactérias benéficas são atraídas pelos exsudatos radiculares, mas que há também os "não convidados", que se ajustam metabolicamente ao uso dos exsudatos liberados pela planta. Sendo assim, surgiu a hipótese de que "a resistência das plantas para a patogênese é dependente da composição do microbioma da rizosfera" (HARTMANN et al., 2008).

A rizosfera pode ser definida como a região do solo que é influenciada pela raiz da planta, ambiente esse rico em nutrientes e conseqüentemente em microrganismos. A exsudação de moléculas de baixo peso molecular oriunda da raiz resulta na seleção e na atração da biomassa microbiana que, em comparação com o solo distante de raízes, encontra condições de alta disponibilidade de nutrientes nesta região, aumentando sua abundância (Figura 4.1) (BAIS et al., 2006). Os microrganismos residentes na rizosfera podem beneficiar ou prejudicar a planta e assim influenciar diretamente o desenvolvimento das culturas (BARRET et al., 2011). A região da rizosfera é composta por três zonas que são didaticamente definidas com base na proximidade em relação à raiz: *i*) endorrizosfera que inclui porções do córtex e endoderme (espaço apoplástico); *ii*) rizoplano é a zona medial adjacente à raiz incluindo a epiderme e a mucilagem e *iii*) ectorrizosfera que se estende para fora a partir do rizoplano (CAVAGLIERI et al., 2009). Num comparativo, a rizosfera inicialmente descrita por Hiltner é a ectorrizosfera descrita em 2009 por Cavaglieri et al. (2009).

Nos solos, as raízes da planta crescem e secretam uma matriz diversificada de exsudatos orgânicos que estimulam o crescimento de comunidades microbianas presentes na rizosfera. A abundância e diversidade microbiana está ativamente envolvida no desenvolvimento vegetal, catabolizando a matéria orgânica, e atuando na mineralização de nutrientes, na fixação de nitrogênio, na proteção contra pragas e controle de patógenos. Entretanto, as espécies de plantas, bem como os tipos de comunidades vegetais, podem afetar a diversidade estrutural e funcional da comunidade microbiana da rizosfera, principalmente devido a variações na composição dos exsudatos radiculares e dos sinais bioquímicos neles contidos, que influenciam diretamente o comportamento das bactérias na rizosfera. Os inúmeros processos que ocorrem nesta região são cruciais para a saúde da planta e influenciam diretamente o ecossistema como um todo (BERG; SMALLA, 2009; RIBEIRO; CARDOSO, 2012).

4.2. Papel dos microrganismos rizosféricos no desenvolvimento da planta

A microbiota dos solos é carente de carbono, ou seja, faltam compostos orgânicos energéticos para sua nutrição. As plantas, porém, secretam até 40% dos seus fotossintatos na rizosfera elevando a densidade da população microbiana na rizosfera em relação ao solo, e este fenômeno é conhecido como "efeito rizosférico".

A abundância microbiana presente no solo é alta, em torno de 10^9 células por grama de solo, sendo esta composta por milhares de espécies microbianas. Esta diversidade microbiana no solo pode ser localmente perturbada por múltiplos fatores, desde aqueles relacionados ao manejo dos solos, como aqueles induzidos pela presença das raízes das plantas. Estudos têm mostrado que a estrutura da comunidade microbiana do solo é distinta da encontrada na rizosfera, sendo a rizosfera comumente composta por uma maior abundância de organismos, porém com uma menor diversidade biológica (FIERER et al., 2007; BARRET et al., 2011). Esta característica ocorre devido ao fato de a comunidade biológica da rizosfera ser composta de organismos recrutados a partir da biodiversidade total encontrada no solo adjacente.

Dessa forma, os estudos baseados na ecologia microbiana da rizosfera buscam conhecer: *i)* comunidades bacterianas que são selecionadas na rizosfera de diferentes espécies de plantas; *ii)* as funções metabólicas e genéticas dessas comunidades; *iii)* a aplicação deste conhecimento para enriquecer processos mutualísticos entre plantas e microrganismos. Embora vários estudos prospectam a presença de bactérias na rizosfera por meio da análise taxonômica de organismos

encontrados neste nicho, esta abordagem não tem mostrado a funcionalidade dessas comunidades na rizosfera. Assim, como estratégia alternativa, para entender a funcionalidade da comunidade microbiana, deve-se utilizar metodologias que descrevam processos funcionais relacionados à rizosfera (TRINGE et al., 2005, HUGENHOLTZ; TYSON, 2008). No entanto, a função de um organismo é influenciada pelo ambiente. Assim, pode ocorrer que na rizosfera os organismos apresentem funcionalidades distintas das que possuem quando no ambiente solo. Dessa forma, numa comparação entre solo e rizosfera, a redução da diversidade microbiana pode não resultar em uma diminuição das funções do ecossistema, mas sim num enriquecimento das funções de maior interesse e relacionadas à promoção do desenvolvimento vegetal (NANNIPIERI et al., 2003; MARKOWITZ et al., 2008).

A comunidade microbiana da rizosfera exerce efeitos sobre a comunidade vegetal, atuando na produtividade e nas características das plantas, resultando em uma resposta de retroalimentação e na mudança da biomassa da comunidade microbiana (ZAK et al., 2003). Sendo assim, a planta molda a biomassa microbiana que se aproxima de suas raízes, promovendo tanto o aumento como a intensificação de funções microbianas na rizosfera. Este processo está intimamente ligado à mineralização do carbono orgânico no solo, sendo a rizodeposição a principal fonte de entrada de carbono assimilável no solo, induzindo um incremento na atividade metabólica na rizosfera (Figura 4.1).

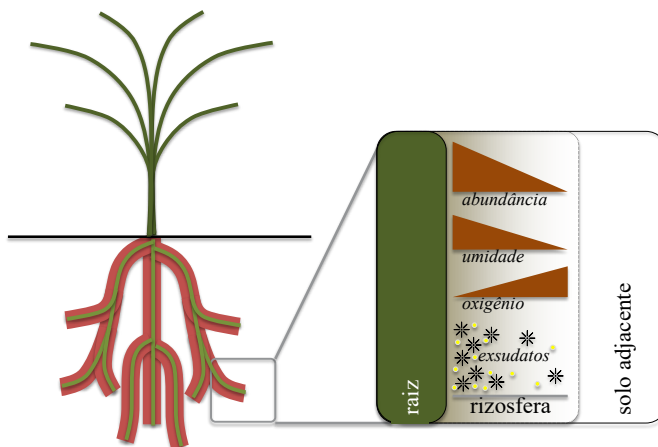


Figura 4.1 - Modelo de recrutamento de microrganismos benéficos na rizosfera das plantas. São mostradas algumas características que podem resultar em benefícios para determinados microrganismos do solo, os quais serão selecionados.

Inúmeros estudos revelaram que determinados táxons ou grupos de microrganismos possuem a capacidade de suprimir doenças na rizosfera (GARBEVA et al., 2004; MENDES et al., 2011). A descrição deste processo faz com que o mesmo possa ser melhor explorado em benefício da agricultura. Uma das explicações deste processo está embasada no fato de que um aumento da abundância microbiana dá origem a uma microbiota estável, não permitindo a multiplicação intensa de agentes patogênicos e, conseqüentemente, protegendo a planta (MARON et al., 2010; MENDES et al., 2011). Este fenômeno é conhecido como supressão geral de doença e esta atividade é atribuída à microbiota total (HOITINK; BOEHM, 1999).

No entanto, existem vários fatores-chaves envolvidos na saúde do solo. Um deles é a exsudação radicular específica que pode atrair os microrganismos específicos (RUDRAPPA et al., 2008). Além disso, a quimiotaxia é um fenômeno que resulta de um sinal bioquímico com o qual as plantas recrutam os microrganismos na rizosfera, por meio da liberação de hidratos de carbono e aminoácidos específicos (SOMERS et al., 2004). Por exemplo, os exsudatos possuem a capacidade de influenciar a motilidade flagelar em algumas bactérias na rizosfera (De WEERT et al., 2002). Assim sendo, o patógeno originário do solo precisa crescer saprofiticamente na rizosfera e alcançar um número suficiente para que possa infectar o tecido da planta e escapar da zona de competição.

4.3 A complexidade do microbioma da rizosfera

Muitos estudos baseiam-se na pesquisa individual de grupos microbianos presentes na rizosfera. Estes trabalhos exploram o potencial destes grupos em funções específicas, como na supressão de doenças ou na habilidade microbiana de fornecer nutrientes às plantas. Um destes trabalhos mostra a ampla gama de características benéficas ao desenvolvimento vegetal encontrada em isolados afiliados a *Burkholderia* spp. na rizosfera de cana-de-açúcar (LUVIZOTTO et al., 2010). Estas bactérias são capazes de sintetizar moléculas análogas a fitormônios (por exemplo ácido indol-acético) e inibir o desenvolvimento de fungos patogênicos, além de fixar nitrogênio e quelar ferro (via produção de sideróforos). Outro exemplo está relacionado a bactérias fixadoras de nitrogênio, sejam estas simbióticas ou associativas (ver capítulos 8 e 9), ambas inicialmente atraídas pelas plantas num processo de ocupação do espaço rizosférico.

Contudo, podemos imaginar que de forma conjunta, o microbioma da rizosfera possa hospedar muitas outras funções não encontradas quando seus componentes são estudados separadamente. Por exemplo, sabe-se que a supressão de doenças é um processo eficiente na rizosfera, sendo esta gerada pela atividade conjunta de seu microbioma (HAZEN et al., 2010). O estudo mais detalhado sobre este assunto indica que mais de 33 mil grupos microbianos (entre bactérias e arqueias) são encontradas na rizosfera de plantas cultivadas em solo supressivo (MENDES et al., 2011). Há indicativos de que os grupos Gammaproteobacterias, Betaproteobacterias e Firmicutes tenham papel fundamental na supressividade de doenças na rizosfera (BERENDSEN et al., 2012).

A composição do microbioma da rizosfera é também alterada de acordo com a sanidade vegetal. Sabe-se que quando a planta é atacada por um patógeno, ocorrem alterações na composição do microbioma de sua rizosfera. Este fato foi demonstrado pela infecção de citros por *Candidatus Liberibacter asiaticus*, o que alterou drasticamente a composição microbiana da rizosfera de citros. A colonização da raiz do algodoeiro pelo patógeno *Verticillium dahliae* também afetou a composição microbiana da rizosfera de algodão (TRIVEDI et al., 2012; ZHANG et al., 2011). Tais mudanças na composição da rizosfera quando da ocorrência de um patógeno indicam que a planta pode, neste momento, alterar a composição de seus exsudatos radiculares, selecionando grupos microbianos específicos que a auxiliem no combate ao patógeno.

4.4. A Seleção das Plantas na Rizosfera

A planta seleciona microrganismos específicos para ocupar a rizosfera, os quais são caracterizados pelo genótipo da planta e o tipo de solo, importantes motores na composição da comunidade microbiana da rizosfera. Assim, as comunidades microbianas nas rizosferas de diferentes espécies de plantas que crescem no mesmo solo são diferenciadas. Este fato sugere que as plantas sejam capazes de moldar a composição da microbiota na sua rizosfera (BAIS et al., 2006; BERG et al., 2009; GARBEVA et al., 2011; MICALLEF et al., 2009). A planta pode determinar a composição da microbiota da raiz por secreção ativa de compostos, os quais estimulam ou reprimem especificamente alguns membros da comunidade microbiana (DOORNBOS et al., 2012). Alguns compostos exsudados de cultivos puros de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*), pepino (*Cucumis sativus*) e pimentão (*Capsicum annum*), tais como ácidos orgânicos, ácido

cítrico, ácido succínico e o ácido málico, são descritos como ativadores de grupos microbianos específicos no solo que, após receberem estes compostos, passam a ocupar a rizosfera destas plantas (KAMILOVA et al., 2006; HAICHAR et al., 2008).

Em um estudo sobre a composição da comunidade bacteriana da rizosfera encontrada em dois diferentes solos, onde foram cultivadas três cultivares de batata, foi determinado que de um total de 2.432 grupos microbianos analisados, 40% mostraram variações na sua abundância entre os solos, enquanto que as variações promovidas por alterações no genótipo da planta foram quantificadas entre 4 e 9% dos grupos (WEINERT et al., 2011). Estes resultados indicam a importância do solo na determinação de comunidades rizosféricas, assim como também a presença de alguns microrganismos com afinidade especial por certos genótipos de plantas.

Baseados nesta observação, podemos considerar a rizosfera como um nicho importante a ser explorado em estudos sobre o efeito do cultivo de plantas transgênicas sobre a comunidade microbiana do solo. Neste sentido, diversos trabalhos compararam a estruturação de comunidades microbianas do solo encontradas em cultivares transgênicos, em relação às variedades e cultivares tradicionais (ANDREOTE et al., 2009, 2010; COTTA et al., 2014). Em linhas gerais, os efeitos encontrados nestes trabalhos foram pontuais em solos específicos, ou em determinados estádios de desenvolvimento vegetal, onde a fisiologia diferenciada da planta transgênica atuou como moduladora da composição distinta do microbioma da rizosfera.

4.5. As rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs)

Dentre os organismos selecionados na rizosfera, destacam-se as rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs). Estas bactérias são definidas com alta afinidade de ocupação do ambiente rizosférico, e capazes de desempenhar atividades relacionadas à promoção do desenvolvimento das plantas. Os mecanismos descritos que caracterizam esta habilidade podem ser divididos em dois grupos: mecanismos diretos e indiretos da promoção do desenvolvimento vegetal (CARDOSO et al., 2011)

4.5.1. Mecanismos diretos de promoção do crescimento de plantas

Os mecanismos diretos são aqueles nos quais a interação é direta entre as rizobactérias e as plantas ou promotores de doenças nas plantas, sendo estes mecanismos descritos basicamente em dois processos.

O primeiro deles é a suplementação nutricional das plantas, feita por microrganismos da rizosfera capazes de fixar nitrogênio, solubilizadores de fósforo, ou qualquer outro processo capaz de suprir a planta com alguns de seus nutrientes, previamente não disponíveis à mesma. O segundo mecanismo deste grupo é desempenhado por grupos microbianos capazes de inibir diretamente o desenvolvimento de pragas e patógenos de plantas. Esta atividade está diretamente ligada à produção de compostos específicos, como por exemplo, antibacterianos e antifúngicos, que impedem o ataque de patógenos de plantas (VASCONCELLOS; CARDOSO, 2009). Um exemplo específico pode ser dado com base no estudo que descreve o grupo das Pseudomonadaceas fluorescentes como produtoras do antibiótico chamado de 2,4-DAPG, o qual é extensivamente estudado como um protetor contra as doenças de solo e que foi diretamente ligado à supressão de doenças (RAAIJMAKERS; WELLER, 1998; GARBEVA et al., 2004)

4.5.2. Mecanismos indiretos de promoção do crescimento de plantas

Os mecanismos indiretos englobam aqueles em que o efeito de promoção do crescimento vegetal ocorre como consequência da atividade de grupos microbianos específicos na rizosfera das plantas. Diversos mecanismos são descritos dentro deste grupo, como por exemplo: disponibilização de nutrientes via degradação de compostos orgânicos, ativação do sistema de defesa vegetal, produção de agentes quelantes, produção de moléculas análogas a fitormônios, entre outros.

Dentro do primeiro grupo, os decompositores têm papel importante, sendo por meio de sua atividade de mineralização liberadas grandes quantidades de nutrientes que, indiretamente, podem suprir o desenvolvimento vegetal. Este processo tem grande importância em solos de ambientes naturais, onde a ciclagem de nutrientes é a base da nutrição vegetal.

A ativação do sistema de defesa da planta também é um processo descrito como importante promotor do crescimento das plantas. Neste, as rizobactérias atuam de forma a disparar na planta sistemas de defesa que

lhes conferem uma maior resistência ao ataque de pragas ou patógenos, num processo conhecido como indução de resistência sistêmica (IRS) (CHAPARRO et al., 2012). De maneira geral, pode-se fazer um paralelo deste processo com um processo de 'vacinação' da planta, desde que se resguarde o fato de o processo não ser intermediado por um sistema imunológico, inexistente nas plantas.

Também resulta na inibição da atividade de patógenos na rizosfera a alta exsudação de moléculas quelantes de íons por rizobactérias. Neste ponto ganha destaque a produção de sideróforos, que são compostos que indisponibilizam íons de ferro para a nutrição de organismos oportunistas na rizosfera, indiretamente protegendo a planta do ataque dos mesmos.

Por fim, a produção de moléculas análogas a fitormônios, com destaque para as similares ao ácido indol-acético, fazem com que um rápido e mais intenso crescimento vegetal dê origem a uma maior resistência da planta a estresses bióticos como abióticos (CHAPARRO et al., 2012).

4.6. Produtividade das plantas associadas aos microrganismos na agricultura

A utilização de microrganismos benéficos na agricultura pode maximizar a absorção de nutrientes, aumentando o crescimento vegetal, conferindo resistência a estresse abiótico e suprimindo doenças em diversas culturas (CUMMINGS, 2009; GUIÑAZÚ et al., 2009; De VLEESSCHAUWER; HÖFTE, 2009). Estes microrganismos são dinâmicos e potencialmente autossustentáveis, reduzindo a necessidade de aplicações repetidas (LUCAS, 2011).

Uma das técnicas relacionadas a este tipo de utilização é caracterizada pela aplicação de rizobactérias promotoras de crescimento (PGPR) (FLIESSBACH et al., 2009), sendo estas inoculações passíveis de sucesso quando os microrganismos benéficos auxiliam na disponibilidade de nutrientes para a planta e na ocupação de nichos, aumentando a resistência do ambiente rizosférico contra a invasão de microrganismos patogênicos (LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009). O uso de inoculantes microbianos (PGPR) em culturas de tomate mostrou uma queda de 75% no uso de fertilizantes e estas produziram rendimentos idênticos a plantas não inoculadas que receberam tratamento completo (ADESEMOYE et al., 2009). Outras frentes de trabalho que utilizam este conceito buscam

alternativas para aumento da biodiversidade dos solos, o que resulta num processo mais eficiente da planta na composição de sua rizosfera, o que lhe permite explorar melhor o potencial deste microbioma. Este tipo de aumento da biodiversidade do solo é promovido principalmente pela adição de materiais contendo alta quantidade e biodiversidade de vida microbiana como, por exemplo, pela adição de compostos orgânicos a este sistema.

O entendimento dessas interações deverá cada vez mais fornecer subsídios para a produção sustentável de alimentos, tendo como base os mais diversos processos microbianos desenvolvidos na rizosfera e, ainda negligenciados quanto ao seu uso consciente na produção vegetal.

4.7. Estudo de Caso

Uma das principais características do solo que produz um bom funcionamento do sistema rizosférico está ligado à diversidade biológica que este hospeda. Frente a isso, como podemos auxiliar na solução de um problema encontrado por um agricultor que verificou que todas as plantas cultivadas em uma determinada área tendem a atrair em suas raízes organismos oportunistas? Este fato é relatado pelo produtor como alta ocorrência de nematoides e alta incidência de doenças de raiz. O que pode ser feito para que este produtor explore melhor a capacidade da planta em recrutar organismos protetores na região próxima a suas raízes?

Referências

ADESEMOYE, A.O.; TORBERT, H.A.; KLOPPER, J.W. Plant growth promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. **Microbial Ecology**, New York, v. 58, p. 921–929, 2009.

ANDREOTE, F.D. et al. Bacterial community in the rhizosphere and rhizoplane of wild type and transgenic eucalyptus. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 25, p. 1065-1073, 2009.

_____. Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*). **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 97, p. 389-399, 2010.

BAIS, H.P. et al. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 233–266, 2006.

BARRET, M.; MORRISSEY, J.P.; O'GARA, F. Functional genomic analysis of plant growth-promoting rhizobacterial traits involved in rhizosphere competence. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 47, p. 729–743, 2011.

BERENDSEN, R.L.; PIETERSE, C.M.J.; BAKKER, P.A.H.M. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 17, n. 8, p. 478–86, 2012.

BERG, G. Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 84, p. 11–18, 2009.

BERG, G.; SMALLA, K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 68, p. 1–13, 2009.

CARDOSO, E.J.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. 360 p.

CARDOSO, E.J.B.N. et al. PGPR in coniferous trees. In: MAHESHWARI, D.K. **Bacteria in agrobiologia: crop ecosystems**. New York: Springer, 2011. p. 345-360.

CAVAGLIERI, L.; ORLANDO, J.; ETCHEVERRY, M. Rhizosphere microbial community structure at different maize plant growth stages and root locations. **Microbiological Research**, Jena, v. 164, p. 391-399, 2009.

CHAPARRO, J.M. et al. Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 48, n. 5, p. 489-499, 2012.

COTTA, S.R. et al. Different effects of transgenic maize and nontransgenic maize on nitrogen-transforming archaea and bacteria in tropical soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Berlin, v. 80, p. 6437-6445, 2014.

CROWDER, D.W. et al. Organic agriculture promotes evenness and natural pest control. **Nature**, London, v. 466, p. 109–112, 2010.

- CUMMINGS, S.P. The application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in low input and organic cultivation of graminaceous crops; potential and problems. **Environmental Biotechnology**, Bethesda, v. 5, p. 43–50, 2009.
- DE VLEESSCHAUWER, D.; HÖFTE, M. Rhizobacteria-induced systemic resistance. **Advances in Botanical Research**, Burlington, v. 51, p. 223–281, 2009.
- DE WEERT, S. et al. Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 36, p. 534–538, 2002.
- DOORNBOS, R.F.; VAN LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 32, p. 227–243, 2012.
- FIERER, N. et al. Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 7059–7066, 2007.
- FLIESSBACH, A. et al. Soil amendment with *Pseudomonas fluorescens* CHA0: lasting effects on soil biological properties in soils low in microbial biomass and activity. **Microbial Ecology**, New York, v. 57, p. 611–623, 2009.
- GARBEVA, P.; VAN VEEN, J.A.; VAN ELSAS, J.D. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 243–270, 2004.
- GARBEVA, P. et al. Transcriptional and antagonistic responses of *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 to phylogenetically different bacterial competitors. **The ISME Journal**, New York, v. 5, p. 1–13, 2011.
- GUIÑAZÚ, L.B. et al. Response of alfalfa (*Medicago sativa* L.) to single and mixed inoculation with phosphate-solubilizing bacteria and *Sinorhizobium meliloti*. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 46, p. 185–190, 2009.
- HAICHAR, F.Z. et al. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. **The ISME Journal**, New York, v.2, p.1221–1230, 2008.

HARTMANN, A.; ROTHBALLER, M.; SCHMID, M. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. **Plant and Soil**, Hague, v. 312, n. 1/2, p. 7–14, 2008.

HAZEN, T.C. et al. Deep-sea oil plume enriches Indigenous oil-degrading bacteria. **Science**, New York, v. 330, p. 204–208, 2010.

HILTNER, L. Über neue Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. Arb. **Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft**, Berlin, v. 98, p. 59–78, 1904.

HOITINK, H.; BOEHM, M. Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 427–446, 1999.

HUGENHOLTZ, P.; TYSON, G.W. Microbiology: metagenomics. **Nature**, London, v. 455, p. 481–483, 2008.

KAMILOVA, F. et al. Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 19, n. 3, p. 250–256, 2006.

LUCAS, J.A. Advances in plant disease and pest management. **The Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 149, p. 91–114, 2011,

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 63, p. 541–556, 2009.

LUVIZOTTO, D.M. et al. Genetic diversity and plant-growth related features of Burkholderia spp. from sugarcane roots. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 1829–1836, 2010.

MARKOWITZ, V.M. et al. IMG/M: a data management and analysis system for metagenomes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 36, p. 534–538, 2008

MARON, J.L. et al. Soil fungal pathogens and the relationship between plant diversity and productivity. **Ecology Letters**, Oxford, v. 14, p. 36–41, 2010.

MENDES, R. et al. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. **Science**, New York, v. 332, n. 6033, p. 1097–1100, 2011.

MICALLEF, S.A.; SHIARIS, M.P.; COLON-CARMONA, A. Influence of *Arabidopsis thaliana* accessions on rhizobacterial communities and natural variation in root exudates. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, p. 1729–1742, 2009.

NANNIPIERI, P. et al. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 54, p. 655–670, 2003.

RAAIJMAKERS, J.M. et al. Dose-response relationships in biological control of *Fusarium* wilt of radish by *Pseudomonas* spp. **Phytopathology Journal**, New York, v. 85, n. 10, p. 1075–1081, 1995.

RIBEIRO, C.M.; CARDOSO, E.J.B.N. Isolation, selection and characterization of root-associated growth promoting bacteria in Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*). **Microbiological research**, Amsterdam, v. 16, n. 2, p. 69-78, 2012.

RUDRAPPA, T. et al. Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. **Plant Physiology**, Washington, v. 148, p. 1547–1556, 2008.

SOMERS, E.; VANDERLEYDEN, J.; SRINIVASAN, M. Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 30, p. 205–240, 2004.

TRINGE, S.G. et al. Comparative metagenomics of microbial communities. **Science**, New York, v. 308, p. 554–557, 2005.

TRIVEDI, P. et al. Huanglongbing alters the structure and functional diversity of microbial communities associated with citrus rhizosphere. **The ISME Journal**, New York, v. 6, n. 2, p. 363–383, 2012.

VASCONCELLOS, R.L.F.; CARDOSO, E.J.B.N. Rhizospheric streptomycetes as potential biocontrol agents of *Fusarium* and *Armillaria* pine rot and as PGPR for *Pinus taeda*. **Biocontrol**, Dordrecht, v. 54, n. 6, p. 807-816, 2009.

WEINERT, N. et al. PhyloChip hybridization uncovered an enormous bacterial diversity in the rhizosphere of different potato cultivars: many common and few cultivar-dependent taxa. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 75, n. 3, p. 497–506, 2011.

ZAK, D.R. et al. Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: are there any links? **Ecology**, New York, v. 84, n. 8, p. 2042–2050, 2003.

ZHANG, Y. et al. Analysis of bacterial communities in rhizosphere soil of healthy and diseased cotton (*Gossypium* sp.) at different plant growth stages. **Plant Soil**, Hague, v. 339, n. 1, p. 447–455, 2011.

CAPÍTULO 5

METABOLISMO MICROBIANO

Daniel Bini, Maryeimy Varón Lopez, Elke JBN Cardoso

5.1. Introdução

Para compreender a função da grande diversidade e plasticidade metabólica dos microrganismos presentes no sistema solo-planta é necessário compreender a maneira como eles satisfazem suas demandas por C e nutrientes e os mecanismos que apresentam para adquirir, manter e transferir a energia necessária para os processos de quebra e síntese de compostos orgânicos.

Basicamente, dois processos sustentam a vida no planeta: a fotossíntese e a decomposição, que são processos geradores e/ou consumidores de energia celular assim como de construção e desconstrução de estruturas orgânicas. Esses dois processos, de grande ocorrência nos microrganismos, envolvem um grande número de reações bioquímicas complexas. A maioria dos processos bioquímicos dos microrganismos procariotos (bactérias e arqueias) também ocorre nos microrganismos eucariotos (fungos e protozoários) e nas células dos organismos pluricelulares ou multicelulares, incluindo os seres humanos. No entanto, existem reações únicas para os procariotos, que comumente não são realizadas por outros organismos (ex: digestão completa da celulose e do petróleo, fixação biológica de N, desnitrificação, respiração anaeróbica).

Neste capítulo serão abordadas as principais reações químicas de produção (reações catabólicas) ou de uso de energia (reações anabólicas), realizadas pelos microrganismos do solo, assim como as condições para que determinadas vias metabólicas sejam ativadas.

5.2. Conceitos Gerais de Metabolismo

O termo metabolismo refere-se à soma de todas as reações químicas que ocorrem dentro de um organismo vivo. O metabolismo pode ser didaticamente dividido em duas classes de reações químicas: aquelas que liberam energia (reações catabólicas) e aquelas que requerem energia (reações anabólicas) (Figura 5.1).

Reações catabólicas ou degradativas: são reações químicas reguladas por enzimas que liberam energia, vinculadas com a quebra de compostos orgânicos complexos em compostos mais simples. As reações catabólicas em geral são reações hidrolíticas (reações que usam água) e são exergônicas (produzem energia). Ex: quebra do açúcar (glicose, frutose, etc) em dióxido de carbono e água.

Reações anabólicas ou de biossíntese: são reações reguladas por enzimas que requerem energia. Estão vinculadas à construção de moléculas orgânicas complexas a partir de moléculas mais simples. As reações anabólicas podem envolver reações de síntese por desidratação (reações que liberam água) e são endergônicas (consomem energia). Ex.: síntese de proteínas a partir de aminoácidos ou a construção de polissacarídeos a partir de açúcares simples.

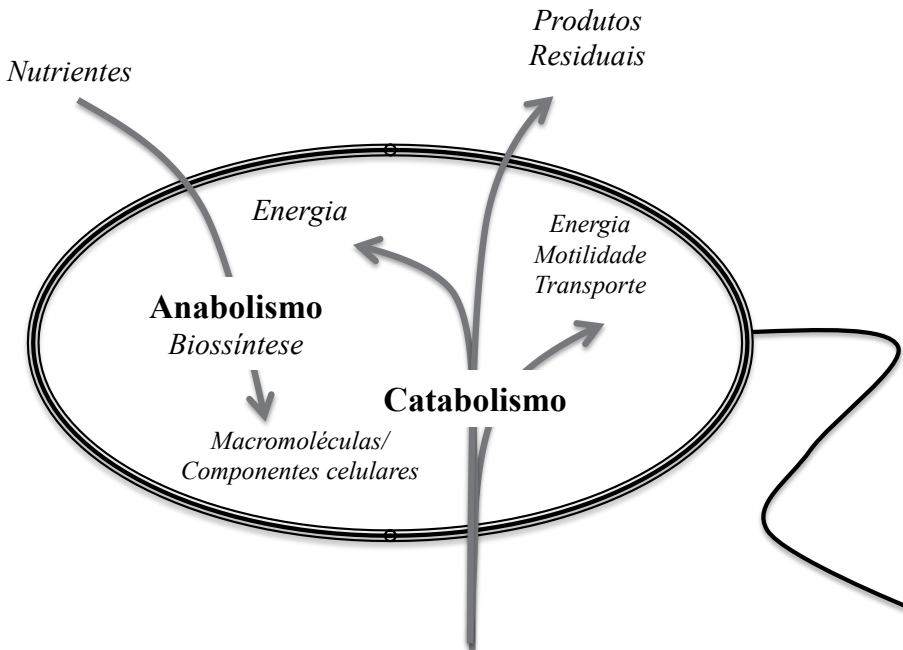


Figura 5.1 - Esquema básico do metabolismo celular (anabolismo e catabolismo).

As reações de anabolismo e catabolismo são acopladas, ou seja, as reações catabólicas fornecem os blocos construtivos para as reações anabólicas e a energia necessária para dirigi-las. Esse acoplamento é possível pela molécula de trifosfato de adenosina (ATP), que funciona como a unidade armazenadora/geradora de energia para as realizações de trabalho biológico nas células. A molécula de ATP é formada por uma base nitrogenada (adenina), um açúcar (ribose) e uma cadeia de três grupos fosfatos.

A hidrólise do ATP ocorre com a quebra da ligação entre os grupos fosfatos, gerando energia livre, ADP e um íon fosfato (HPO_4^{-2}). Para tanto, as reações anabólicas necessitam da quebra do ATP. Já as reações catabólicas são acopladas à síntese do ATP.

Estas reações metabólicas (anabolismo e catabolismo) envolvem muitas proteínas, denominadas enzimas. As vias metabólicas da célula (sequências de reações químicas) são determinadas por suas enzimas que, por sua vez, são determinadas pela constituição genética da célula. As enzimas são moléculas capazes de acelerar as reações químicas, sendo consideradas catalizadores de reações. Dentro da célula, cada enzima atua em uma substância específica, chamada de substrato da enzima. O complexo enzima-substrato formado pela ligação temporária da enzima com os reagentes permite que haja colisões entre átomos, íons ou moléculas, com diminuição da energia de ativação necessária para que haja uma reação.

Em geral, os nomes das enzimas terminam em "ase". Por exemplo, a classe chamada de oxidoredutase está envolvida nas reações de oxidação-redução. Especificadamente, as desidrogenases fazem parte da classe das oxidoredutases, sendo enzimas que removem H^+ a partir de um substrato; por outro lado, aquelas enzimas que adicionam oxigênio (O_2) são chamadas de oxidases.

5.3. Diversidade Metabólica Microbiana nos Solos

O solo é um compartimento em que ocorrem inúmeras reações metabólicas complexas, sendo que os microrganismos são os principais desencadeadores destes fenômenos. Neste caso, o conceito básico de organismos heterotróficos e autotróficos é simplificado demais quando se trata de microrganismos com toda sua grande plasticidade metabólica. Assim, os microrganismos podem ser classificados de acordo com sua fonte de energia, sua fonte de C e demais nutrientes (Figura 5.2).

Fonte de energia: os microrganismos podem ser categorizados como fototróficos ou quimiotróficos. Os fototróficos usam a luz como fonte primária de energia. Os quimiotróficos dependem das reações de oxidação-redução de compostos inorgânicos e/ou orgânicos para gerar energia (catabolismo).

Fonte de C e nutrientes: os microrganismos podem ser classificados como: autotróficos ou litotróficos, os quais utilizam fontes de C inorgânico como o CO_2 , e os heterotróficos ou organotróficos, que requerem fonte de carbono orgânica, muitas vezes encontradas na matéria orgânica do solo.

A grande maioria dos microrganismos encontrados no solo é heterotrófica e quimiotrófica. Neste caso, são denominados quimiorganotróficos ou quimioheterotróficos, uma vez que utilizam fontes orgânicas como fontes de energia, C e nutrientes para manter seu metabolismo e crescimento. Os fungos são os maiores exemplos desse tipo de metabolismo, uma vez que têm grande papel no processo de decomposição da matéria orgânica do solo. Neste grupo fisiológico podem-se destacar também os simbioses, como os rizóbios, que necessitam de compostos orgânicos fornecidos pela planta para manter seu metabolismo e fixar nitrogênio atmosférico.

No entanto, outros grupos microbianos existem no solo, como os quimiolitotróficos (ex.: nitrificadores), os fotolitotróficos (cianobactérias e bactérias verdes do enxofre) e os fotorganotróficos (bactérias púrpuras do enxofre) que são alternativas para produção de energia e captação de C e nutrientes no solo (CARDOSO et al., 1992).

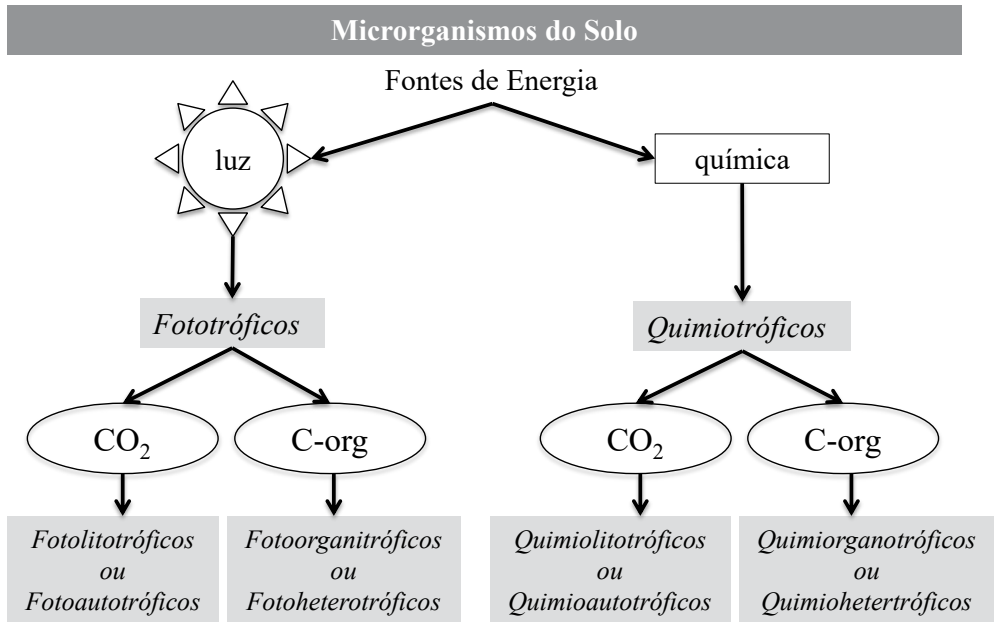


Figura 5.2 - Grupos metabólicos microbianos encontrados nos solos (modificado de Van Elsas et al., 2006).

5.3.1. O papel da aerobiose e anaerobiose no metabolismo microbiano

Os processos detalhados anteriormente só são passíveis de ocorrer em função da presença ou ausência de oxigênio no ambiente. Dá-se o nome de microrganismos aeróbios àqueles com a capacidade de exercer seu metabolismo em uma atmosfera contendo O_2 , que atua como receptor ou acceptor final de elétrons na cadeia transportadora de elétrons, ao final da respiração celular, originando H_2O .

Em contrapartida, são denominados microrganismos anaeróbios aqueles em que, geralmente, o O_2 é tóxico ao seu metabolismo, sendo muitos grupos específicos de condições anóxicas. Neste caso, outros elementos serão utilizados como acceptor final de elétrons no lugar do O_2 , como compostos inorgânicos oxidados (NO_3^- , SO_4^{2-} , CO_2) na respiração anaeróbia ou compostos orgânicos (piruvato, acetaldeído,

CH₄) na fermentação. Bactérias como *Clostridium pasteurianum* são obrigatoriamente anaeróbios (anaeróbios estritos), ou seja, nunca utilizam O₂ comoceptor final de elétrons. No entanto, há grupos denominados anaeróbios facultativos, com a capacidade de crescer utilizando O₂ ou outros compostos inorgânicos oxidados (*Pseudomonas aeruginosa* ou *Thiobacillus denitrificans*). Muitos microrganismos desnitrificantes apresentam essa capacidade, sendo que, em condições de ausência de O₂, utilizam o NO⁻³ comoceptor final de elétrons, originando N₂O ou N₂ ao final do processo (ver capítulo 7). Há também microrganismos denominados microaerófilos que têm a capacidade de crescer em ambientes com baixa quantidade de O₂ atmosférico.

5.3.2. Influência do potencial redox no metabolismo microbiano

O potencial redox (Eh) é uma medida elétrica que apresenta a tendência de um solo em doar ou receber elétrons. O Eh apresenta-se como o indicador mais importante do estado de oxidação ou redução dos solos, determinando a direção das suas reações. Através dos valores do potencial redox é possível saber se o solo está favorecendo processos aeróbios ou anaeróbios e se compostos químicos como os óxidos de Fe e Al ou o N estão quimicamente reduzidos ou em suas formas oxidadas (VEPRASKAS; FAULKNER, 2001).

O Eh do ambiente é que determinará a utilização de um determinadoceptor de elétrons, decorrente da disponibilidade de alguns elementos (O₂, NO⁻³, SO₄⁻², CO₂, compostos orgânicos). Neste caso, determinará se vai ocorrer respiração aeróbia ou anaeróbia. O Eh é medido em milivolts (mV), sendo que valores positivos representam ambientes oxidados. Muitas reações no solo acontecem em Eh maior que +300 mV (Ex.: decomposição). Ambientes oxidados apresentam alta capacidade em receber elétrons, sendo o O₂ abundante e o metabolismo aeróbio favorecido. Um Eh com valor próximo ao 0 indica que o O₂ e NO⁻³ são pouco presentes no ambiente, sendo o ferro e manganês os componentes utilizáveis como aceptores de elétrons (figura 5.3).

A diminuição do potencial redox altera os processos bioquímicos do solo, fato este muito característico em solos alagados (CAMARGO et al., 1999), considerado um ambiente redutor. Microrganismos com respiração anaeróbia facultativa são estimulados em um solo com potencial redox entre +100 a +300 mV (redução do NO₃⁻) e de +100 a -100 mV (redução

de Fe e Mn). Já microrganismos com respiração anaeróbica obrigatório são favorecidos em solos com potencial redox -100 a -200 mV ou até valores menores que -200 mV. Nestas condições há redução de SO_4^{-2} e produção de metano por bactérias metanogênicas. Sendo assim, quanto mais próximo de valores negativos de Eh mais redutor é o solo, o que estimula o metabolismo anaeróbico.

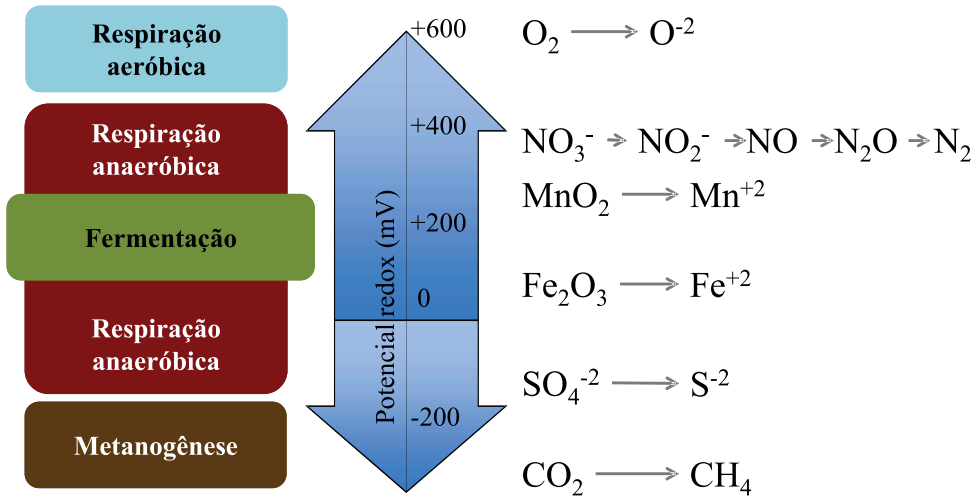


Figura 5.3 - Valores de potencial redox e suas relações com o metabolismo predominante no solo.

A diminuição do potencial redox pode diminuir a biomassa microbiana de C, N e P do solo assim como sua atividade, uma vez que há diminuição na aquisição de energia em decorrência do uso de outros aceptores finais de elétrons menos eficientes que o O_2 . Esses fenômenos também diminuem a capacidade e a velocidade da mineralização de fontes orgânicas de C, N e P do solo (MCLATCHEY; REDDY 1998). Além disso, há indicativos de seleção de grupos específicos de microrganismos para um determinado valor de Eh. Solos de clima tropical apresentam uma microbiota com grande capacidade de suportar variações contínuas no potencial redox, não alterando drasticamente sua estrutura (De ANGELLIS et al., 2010). No entanto, quando esses solos são condicionados por um período de tempo longo a um mesmo potencial redox, sem flutuações, há grandes alterações na comunidade microbiana (De ANGELLIS et al., 2010), com grande prevalência de espécies de metanogênicas em solos redutores.

5.4. Principais Vias Metabólicas dos Microrganismos

Os microrganismos utilizam vias metabólicas para gerar energia (ATP) e biomassa. Essas vias são específicas para cada grupo microbiano e dependem da disponibilidade ou não de O_2 no meio.

A maioria dos microrganismos utiliza a oxidação de lipídeos, proteínas e, principalmente, carboidratos como fonte primária de C e energia celular. Em especial, a quebra das moléculas de carboidrato à glicose para produzir energia é de grande importância para o metabolismo celular. Para produzir energia a partir de glicose os microrganismos utilizam vias metabólicas como: respiração aeróbia, respiração anaeróbia e fermentação.

A seguir são descritas, resumidamente, as vias metabólicas dos microrganismos do solo, baseando-se na oxidação da glicose:

5.4.1. Processos Aeróbios

5.4.1.1. Respiração aeróbia

A respiração aeróbia é a forma de metabolismo presente na maioria dos microrganismos do solo, de grande importância para o processo de decomposição da matéria orgânica. Ocorre em solos com disponibilidade de O_2 e Eh maior que +300 mV (ambiente oxidante). Microrganismos quimiorganotróficos são detentores deste metabolismo. Nessas condições, substratos orgânicos (carboidratos, proteínas e lipídeos) são utilizados como fonte de C e energia. Através da quebra de macromoléculas, pela ação de enzimas extracelulares liberadas pela microbiota do solo, monômeros de glicose, ou até mesmo ácidos graxos e aminoácidos são assimilados pelos microrganismos, iniciando a via glicolítica. Compostos como a glicose, que possui muitos átomos de hidrogênio, são compostos altamente reduzidos, contendo uma grande quantidade de energia potencial. Portanto, a glicose, ao ser assimilada pelo microrganismo, entra em uma cascata de reações que geram ATP e CO_2 (Figura 5.4).

Em condições de aerobiose, a glicose entra na via glicolítica (glicólise) a qual, através da sua oxidação inicial até piruvato, tem um ganho líquido de 2 ATP e 2 NADH. O piruvato é uma molécula que apresenta grande quantidade de energia presa em suas ligações. Essa molécula é utilizada em outra etapa do ciclo metabólico celular, o ciclo de Krebs. Neste ciclo, o piruvato, já convertido em acetilCoA sofre sucessivas oxidações através de uma série de reações enzimáticas. Neste processo há formação de CO_2 , H_2O e átomos de H^+ que são transferidos para moléculas carreadoras (NAD e FAD) (Figura 5.4).

A glicólise e ciclo de Krebs são os processos relacionados com a total oxidação da glicose. Essa oxidação gera H^+ para impulsionar a produção de energia na cadeia transportadora de elétrons na membrana celular de bactérias e arqueias e/ou nas mitocôndrias de organismos eucariotos. Na cadeia transportadora de elétrons o H^+ é transferido ao final do processo para o O_2 (aceptor final de elétrons), o que leva a uma grande produção de ATP e geração de H_2O . O saldo final da respiração aeróbia é de 36 ATP através da fosforilação em nível do substrato (glicólise) e fosforilação oxidativa (cadeia transportadora de elétrons). Na Figura 5.4, há uma representação do metabolismo aeróbio.

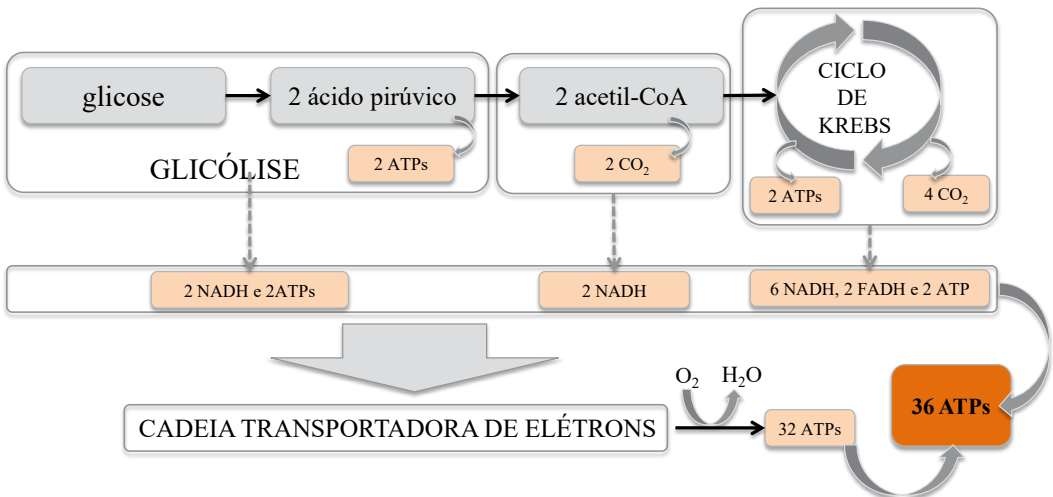


Figura 5.4 - Vias aeróbias do metabolismo microbiano no solo.

5.5.2. Processos Anaeróbios

5.5.2.1. Respiração anaeróbia

A respiração anaeróbia utiliza muitos dos mecanismos descritos para a respiração aeróbia. No entanto, não utiliza o O_2 como acepto final de elétrons. Aceptores alternativos inorgânicos como NO_3^- , SO_4^{2-} , S, CO_2 , entre outros, são utilizados neste processo, que ocorrem em solos com Eh abaixo de +300 mV até valores negativos, condição em que o O_2 é pouco disponível.

A respiração anaeróbia produz menos energia do que a respiração aeróbia. Em processos na ausência de O_2 o ciclo de Krebs é ativo parcialmente e nem todos os transportadores de membrana da cadeia transportadora de elétrons são ativos, fato que diminui a eficiência deste processo em gerar ATP, sendo o rendimento final dependente do aceptor utilizado. Portanto, os microrganismos anaeróbios tendem a crescer mais lentamente que os aeróbios.

Neste contexto, bactérias como *Pseudomonas* e *Bacillus* podem utilizar NO_3^- como aceptor final de elétrons, processo denominado como desnitrificação. Bactérias como *Desulfovibrio* e *Desulfotomaculum* utilizam sulfatos (SO_4^{2-}) como aceptor final de elétrons para formar sulfeto de hidrogênio (H_2S). Processos anaeróbios são importantes contribuintes para o ciclo de nutrientes nos solos bem como permitem que estes organismos colonizem áreas inabitáveis por outros organismos (extremófilos).

5.5.2.2. Fermentação

Fermentação é um processo anaeróbio utilizado pelas bactérias e por leveduras para obter energia. Neste processo não há uso de O_2 ou outro aceptor final de elétrons inorgânico, descritos na respiração aeróbia e anaeróbia, respectivamente. A fermentação apresenta características específicas que a distingue da respiração anaeróbia. Primeiramente, o doador e o aceptor final de elétrons na fermentação são compostos orgânicos. Secundariamente, a produção de energia ocorre apenas a partir da fosforilação ao nível de substrato, na glicólise. Neste caso, pode-se dividir a fermentação em glicólise e redução do ácido pirúvico (Figura 5.5.a).

A glicólise é o conjunto de reações iniciais da degradação da glicose, semelhante em todos os tipos de fermentação e na respiração, com formação líquida de duas moléculas de ATP e 2 moléculas de $NADH_2$ e formação de duas moléculas de ácido pirúvico. A segunda parte da fermentação consiste na redução do ácido pirúvico resultante da glicólise. Cada molécula de ácido pirúvico é reduzida pelo hidrogênio que é libertado pelo $NADH_2$ produzido na glicólise, originando, conforme o tipo de microrganismo fermentativo, ácido láctico, ácido acético ou álcool etílico e dióxido de carbono.

Na fermentação alcoólica as duas moléculas de ácido pirúvico originadas na glicose são convertidas em duas moléculas de acetaldeído e duas de CO_2 . As duas moléculas de acetaldeído são os aceptores finais de elétrons nesse processo, uma vez que são reduzidas por duas moléculas de NADH_2 , originadas na glicólise, para formar duas moléculas de etanol (Figura 5.5b). Esse processo é realizado por diversas bactérias e leveduras, como as do gênero *Saccharomyces*, que são amplamente usadas como tecnologia para produção de combustíveis e indústria de bebidas.

Como complemento, é conhecida como fermentação acética a oxidação parcial do etanol por outras bactérias (bactérias acéticas). As bactérias acéticas são microrganismos de grande interesse econômico devido sua função na produção do vinagre e pelas alterações que provocam nos alimentos e bebidas. As principais bactérias acéticas são representadas pelos gêneros *Acetobacter* e *Gluconobacter*. Na fermentação láctica a formação de ácido láctico é decorrente da redução do piruvato pelas moléculas de NADH_2 , ou seja, o piruvato é o aceptor final de elétrons nesse processo.

Para tanto, o produto final da fermentação é um composto ainda reduzido (ácido láctico, álcool, ácido propiônico, ácido acético, etc), com grande quantidade de energia nas suas ligações. Muitos destes compostos podem ser úteis como substratos em processos de fermentação conhecidos como acidogênese. A partir dos produtos da acidogênese, como CO_2 e H_2 , pode haver a acetogênese com formação de acetato. Este composto é uma das principais fontes de C e energia para os processos de metanogênese (Figura 5.5).

A metanogênese é considerada a etapa final no processo global de degradação anaeróbica de compostos orgânicos em CH_4 e CO_2 , efetuada pelas arqueias metanogênicas, sendo de grande importância no processo de produção de biogás e degradação de matéria orgânica em solos alagados, como nos manguezais. Os microrganismos metanogênicos utilizam somente um limitado número de substratos, compreendendo ácido acético, hidrogênio, dióxido de carbono, ácido fórmico, metanol, metilaminas e monóxido de carbono. Em função de sua afinidade por substrato e devido à magnitude de produção de metano, as metanogênicas são divididas em dois grupos principais: As metanogênicas acetoclásticas (formam CH_4 a partir do ácido acético ou etanol) e as metanogênicas hidrogenotróficas (produzem CH_4 a partir de hidrogênio e dióxido de carbono) (Figura 5.5c).

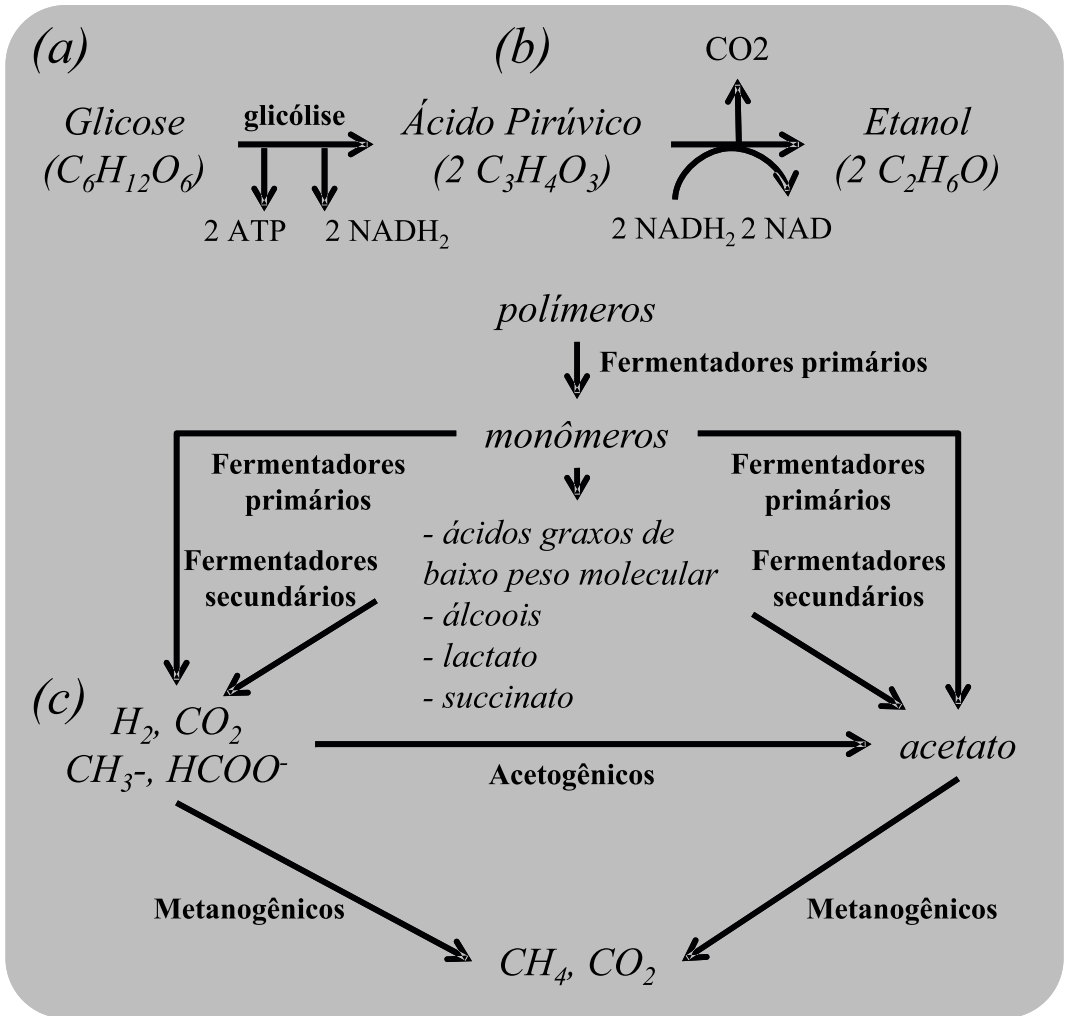


Figura 5.5 - Representação dos processos de glicólise e redução do ácido pirúvico na fermentação (a), fermentação alcoólica (b), e etapas fermentativa de materiais orgânicos (c).

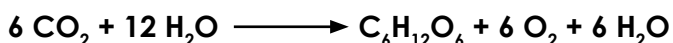
Solos alagados são os principais promotores desse processo, onde o potencial redox pode se encontrar entre -150 e -200 mV (WANG et al., 1993). Com isso há condições necessárias para a atividade das arqueias metanogênicas. Essas são estritamente anaeróbias, condição que é atingida após a redução da maioria dos íons inorgânicos, quando as bactérias passam a utilizar o C como aceptor de elétrons, o que resulta na produção de CH₄ ou CO₂ (PETERS; CONRAD, 1996; van BODEGOM; STAMS, 1999). Em solos cultivados com arroz inundado, as condições de anaerobiose condicionam a produção de CH₄ como produto final da decomposição de compostos orgânicos por microrganismos metanogênicos.

Em contrapartida, existem microrganismos metanotróficos (oxidantes de metano) que utilizam o CH₄ como fonte única de C e energia. Esses microrganismos são considerados aeróbios, embora haja relatos de grupos que oxidam anaerobicamente o metano em água marinha anóxica e em sedimentos de lagos alcalinos e de água doce (HANSON, 1996). Estima-se que esse grupo de microrganismos seja capaz de diminuir em 90% a emissão de metano para a atmosfera, considerando que esse gás apresenta potencial causador do efeito estufa (RASTOGI et al., 2009). Os grupos envolvidos neste processo pertencem principalmente às bactérias das famílias Methylococaceae e Methylocystaceae, caracterizadas pela presença da enzima denominada metano mono-oxigenase (HANSON, 1996).

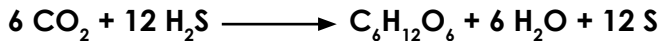
5.5.3. Fotossíntese

Os microrganismos, mais especificamente bactérias e cianobactérias, podem realizar fotossíntese oxigênica ou anoxigênica, a fim de produzir ATP através da fotofosforilação. Neste processo, moléculas orgânicas são sintetizadas (anabolismo) a partir de reações envolvendo a luz, CO₂, água (ou H₂S) e compostos de baixa energia.

A fotossíntese oxigênica realizada por microrganismos é semelhante àquela realizada em plantas, processo pelo qual há síntese de compostos orgânicos a partir da presença de luz, água e gás carbônico, conforme reação abaixo.



No entanto, apesar de serem fotossintetizadoras, as bactérias não possuem o cloroplasto e clorofila, mas sim outra substância parecida, denominada bacterioclorofila. A fotossíntese anoxigênica é um processo de síntese de matéria orgânica em presença da luz, utilizando o gás carbônico do ar atmosférico e gás sulfídrico (H_2S), como substância doadora de hidrogênio. Nesse processo não é a água quem fornece hidrogênio, conforme a reação abaixo:



Os organismos que realizam este processo são as sulfobactérias (bactérias púrpuras e verdes do enxofre) que utilizam H_2S ou S^0 , ou não sulfurosas (bactérias verdes e púrpuras não sulfurosas) que utilizam H_2 ou compostos orgânicos como fonte de elétrons. Estas bactérias vivem em ambientes anaeróbicos e possuem um tipo especial de clorofila, que é a bacterioclorofila. Maiores informações são apresentadas no capítulo 11 (ciclo do enxofre).

5.6. Metabolismo Microbiano do Solo e os Níveis Tróficos

Para entender a funcionalidade dos microrganismos do solo e toda sua diversidade metabólica deve-se considerar primeiramente que o solo é um ambiente altamente heterogêneo, constituído de diferentes frações (areia, silte, argila e matéria orgânica) que promovem variados habitats para os organismos (GARBEVA et al., 2004), tendo na sua preservação uma das principais bases da sustentabilidade ambiental. Para tanto, há vários microsítios no solo que podem apresentar potencial redox, pH, umidade e outros fatores diferenciados, fato este que condiciona grupos microbianos específicos para cada condição. Neste caso, uma grande diversidade metabólica pode ser encontrada no solo, principalmente em solos bem estruturados e de baixa influência antrópica.

Neste caso, existe um fluxo de energia e níveis tróficos entre grupos microbianos do solo, uma vez que compostos orgânicos podem ser oxidados por via aeróbia e concomitantemente produtos desse metabolismo servirem de fonte de C e energia para microrganismos anaeróbios ou fermentadores nos mais variados microsítios do solo. Quanto maior o nível trófico de um grupo microbiano menor será a energia disponível presente nesse grupo. Isso já foi evidenciado anteriormente na descrição dos processos de fermentação do etanol, ácido acético e metanogênese, os quais são acoplados e nos quais a energia disponível vai se dissipando.

Um exemplo clássico desse sinergismo entre grupos microbianos e vias metabólicas pode ser observado na coluna de Winogradsky. A coluna de Winogradsky consiste de uma coluna de vidro na qual é depositada no fundo uma camada de lama ou sedimento que é enriquecido com substratos de carbono orgânico, sulfetos e sulfatos (CaCO_3 e CaSO_4). Após isso a coluna é completada com água e acondicionada em um ambiente luminoso. Após alguns dias de incubação evidencia-se a presença de grupos microbianos separados em faixas de aerobiose, anaerobiose, potencial redox e fonte de C. Inicialmente, o carbono orgânico adicionado promove rápido crescimento microbiano, eliminando o O_2 da zona mais profunda da coluna d'água e formando um gradiente de aeração, no qual somente o topo da coluna permanece aeróbio. Dessa maneira, somente os microrganismos que podem crescer em condições anaeróbias passam a se desenvolver nas zonas mais profundas da coluna (bactérias fermentadoras, com respiração anaeróbia e fotossintetizantes). Inicialmente, algumas espécies de bactérias celulolíticas degradam a celulose em glicose e depois a fermentam para obtenção de energia, produzindo etanol, ácido acético, entre outros. Bactérias redutoras de enxofre (*Desulfovibrio*) podem utilizar esses produtos da fermentação e o sulfato (ou outra forma parcialmente oxidada do enxofre) como aceptor de elétrons, produzindo grande quantidade de H_2S por esse processo. O H_2S pode se difundir para cima da coluna e pode ser utilizado por outros microrganismos. A difusão do H_2S do sedimento para a água permite o crescimento de bactérias fotossintetizantes (anoxigênicas). Essas bactérias (bactérias sulfurosas verdes e púrpuras) obtêm energia da luz e produzem seus materiais celulares a partir do CO_2 , liberando S^0 . O enxofre produzido por essas bactérias retorna ao sedimento e é reciclado pelas bactérias como os *Desulfovibrios* (parte do ciclo do enxofre em águas naturais). A maior parte da coluna d'água acima das bactérias fotossintetizantes pode apresentar um grande número de bactérias púrpuras não-sulfurosas. Essas bactérias crescem em condições anaeróbias, utilizando a energia da luz e ácidos orgânicos (fotorganotróficas). Os ácidos são produtos da fermentação de outras espécies anaeróbias. Entretanto, não toleram altas concentrações de H_2S , ocorrendo, então, faixas de bactérias sulfurosas verdes e púrpuras em camadas. Acima dessa zona há condições de aerobiose e, neste caso, pode haver um grande número de cianobactérias fotossintetizantes (oxigênicos) e bactérias aeróbias quimiorganotróficas (figura 5.6).

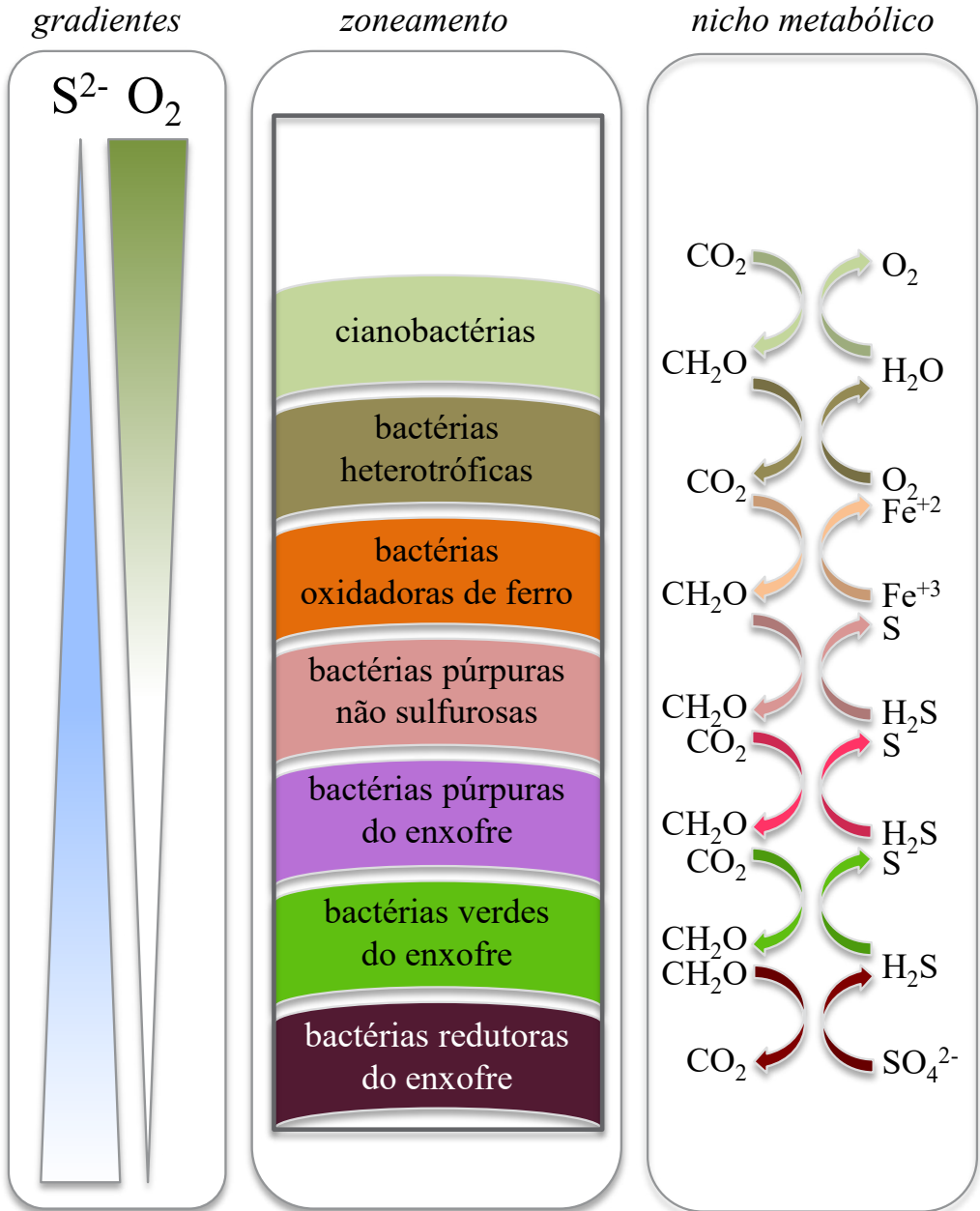


Figura 5.6 - Esquema representativo da Coluna de Winogradsky.

Nesta coluna é possível perceber, de maneira empírica, que cada grupo microbiano em uma faixa ou zona sustenta o desenvolvimento de outros grupos em outras zonas. Esse sinergismo e dinâmica dos níveis tróficos microbianos ao longo da coluna podem ser extrapolados para o solo, uma vez que inúmeros substratos constituem a matéria orgânica do solo em condições de aerobiose e anaerobiose, e que há uma relação direta ou indireta entre a ciclagem de nutrientes e biogeoquímicos envolvendo a microbiota do solo. Muitos destes processos não ocorreriam sem uma microbiota especializada, como as da desnitrificação, nitrificação, metanogênese, etc.

5.7. A Moldagem do Metabolismo Microbiano pela Atividade Agrícola nos Solos

Exemplos mais práticos de seleção de frações desta microbiota adaptadas a diferentes condições ambientais podem ser observados na agricultura em geral. O metabolismo microbiano do solo é amplamente alterado em função das condições impostas por sistemas de manejo (conservacionista ou convencional) (NOGUEIRA et al., 2014; BINI et al., 2014; SANTOS et al., 2015,), uso de resíduos na agricultura (chorume, lodo de esgoto, vinhaça, agroquímicos) (CARDOSO et al., 2011, 2013; SANTOS et al., 2013; NAKATANI et al., 2011; MARTINEZ et al 2010) e mudanças no uso da terra (BINI et al., 2013c; FAGOTTI et al., 2012). Especificamente, esses procedimentos adotados modificam alguns parâmetros do solo, como potencial redox, temperatura, tipo de substrato orgânico (matéria orgânica), pH e umidade. Esses parâmetros estão estritamente relacionados com o metabolismo microbiano do solo como visto anteriormente, pois podem alterar muitos processos microbianos.

Formas de manejo pouco conservacionistas, sem manutenção da palhada, com revolvimento do solo e com intenso uso de maquinarias aceleram a oxidação da matéria orgânica do solo, decorrente do maior acesso dos microrganismos heterotróficos a essas fontes orgânicas que, inicialmente, estavam protegidas em agregados no solo, mas que passam a ser desprotegidas por causa da desestruturação física do solo (agregados). Esse processo acarreta em grande perda de matéria orgânica do solo em longo prazo. Neste aspecto, a saúde do solo é comprometida, uma vez que condições básicas para manutenção sustentável de processos biológicos são alteradas (aeração, umidade, temperatura, fonte de C), muitas vezes com perda de diversidade biológica e metabólica (CARDOSO et al.,

2013). Além disso, a exposição direta à luz solar resulta na morte de muitos organismos vivos que antes estavam encobertos pelo solo.

Para tanto, processos conservacionistas (plantio direto, cultivo mínimo e rotação de culturas) são requeridos para promover menor perda de matéria orgânica na agricultura, com menores prejuízos na perda de C e nutrientes, devido ao estímulo exacerbado da microbiota do solo. Neste sistema pode haver uma decomposição gradual da matéria orgânica, o que pode constituir um equilíbrio no balanço entre a entrada e a saída de matéria orgânica do solo (fontes de C orgânico) e sincronizar a mineralização de nutrientes e a absorção desses nutrientes pelas plantas.

O conhecimento dos processos metabólicos microbianos e dos fatores que modificam seu estado no solo pode ser útil como ferramenta e informação para gerar novas estratégias de manejo visando à sustentabilidade ambiental.

5.8. Estudo de Caso

O metabolismo microbiano é o centro-motor do sistema solo, sendo este responsável pelos mais diversos processos biogeoquímicos que ocorrem neste ambiente. Tendo como base esta afirmação, como podemos auxiliar um agricultor que irá aplicar um agroquímico degradável no solo apenas sob condições de alto potencial redox. Considerando que o solo onde este será aplicado tem textura argilosa, e com alta quantidade de matéria orgânica, quais as precauções que este agricultor pode adotar de maneira a manter constante a decomposição deste composto aplicado ao solo?

Referências

BINI, D. et al. Effects of land use on soil organic carbon and microbial processes associated with soil health in southern Brazil. **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v. 55, p. 117–123, 2013.

_____. Identifying indicators of C and N cycling in a clayey Ultisol under different tillage and uses in winter. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 76, p. 95–101, 2014.

CAMARGO, F.A.O.; SANTOS, G.A.; ZONTA, E. Alterações eletroquímicas em solos inundados. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 1, p. 171-179, 1999.

- CARDOSO, E.J.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. 360 p.
- CARDOSO, E.J.B.N. et al. Recycling industrial and urban wastes in tropical agricultural soils. In: NIELSEN, C.J. (Ed.). **Recycling: processes, costs and benefits**. New York: Nova Science, 2011.
- CARDOSO, E.J.B.N. et al. Soil health: looking for suitable indicators. What should be considered to assess the effects of use and management on soil health? **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 70, n. 4, p. 274-289, 2013.
- DE ANGELLIS, K.M. et al. Microbial communities acclimate to recurring changes in soil redox potential status. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 12, n. 12, p. 3137-3149, 2010.
- FAGOTTI, D.S.L. et al. Gradients in N-cycling attributes along forestry and agricultural land-use systems are indicative of soil capacity for N supply. **Soil Use and Management**, Oxford, v. 28, p. 292-298, 2012.
- GARBEVA, P.; VAN VEEN, J.A.; VAN ELSAS, J.D. Microbial diversity in soil: selection of the microbial populations by plant and soil type and implementations for disease suppression. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 243-270, 2004.
- HANSON, R.S.; HANSON, T.E. Methanotrophic bacteria. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 60, p. 439-471, 1996.
- MCLATCHEY, G.P.; REDDY, K.R. Regulation of organic matter decomposition and nutrient release in a wetland soil. **Journal of Environmental Quality**, New York, v. 27, n. 5, p. 1268-1274, Sept./Oct. 1998.
- MARTINES, A. et al. Ammonia volatilization in soil treated with tannery sludge. **Bioresource Technology**, Essex, v.101, p.4690-4696, 2010.
- NAKATANI, A.S. et al. Changes in the genetic structure of bacteria and microbial activity in an agricultural soil amended with tannery sludge. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 43, p. 106-114, 2011.
- NOGUEIRA, M.A. et al. Indicators of soil quality in the implantation of no-till system with winter crops. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 45, p. 990-998, 2014.

PETERS, V.; CONRAD, R. Sequential reduction processes and initiation of CH₄ production upon flooding of oxic upland soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 28, p. 371-382, 1996.

RASTOGI, G. et al. Isolation and characterization of cellulose-degrading bacteria from the deep subsurface of the Homestake gold mine, Lead, South Dakota, USA. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 36, p. 585-598, 2009.

SANTOS, C.A. et al. Land application of municipal landfill leachate: fate of ions and ammonia volatilization. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 42, n. 2, p. 523-531, 2013.

_____. Reclamation status of a degraded pasture based on soil health indicators. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 72, n. 3, p. 195-202, 2015.

VAN BODEGOM, P.M.; STAMS, A.J.M. Effects of alternative electron acceptors and temperature on methanogenesis in rice paddy soils. **Chemosphere**, Oxford, v. 39, p. 167-182, 1999.

VAN ELSAS, J.D.; JANSSON, J.K.; TREVORS, J. **Modern soil microbiology**. 2nd ed. Wellington; New York: Marcel Dekker, 2006. 672 p.

VEPRASKAS, M.J.; FAULKNER, S.P. Redox chemistry of hydric soils. In RICHARDSON, J.L.; VEPRASKAS, M.J. (Ed.). **Wetland soils: genesis, hydrology, landscapes, and classification**. New York: Lewis Publ., 2001. p. 85-105.

WANG, Z.P. et al. Soil redox and pH effects on methane production in a flooded rice. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 57 p. 382-385, 1993.

CAPÍTULO 6

TRANSFORMAÇÕES DO CARBONO NO SOLO

Carolina Braga Brandani, Danielle Gonçalves dos Santos

6.1. Introdução

A vida como nós a conhecemos está baseada numa estrutura de carbono, o elemento essencial e em maior abundância em toda estrutura celular. Por esse motivo este é o elemento de maior demanda para a formação de novas células e conseqüentemente mais abundantemente necessário para a nutrição de plantas, animais e microrganismos dos solos.

Na biosfera, os grandes reservatórios de carbono estão sob a forma de combustíveis fósseis, ou na forma de carbonatos dissolvidos nas águas oceânicas. No entanto, a fração do carbono do solo suscetível a ser utilizada no processo nutricional dos organismos que ocupam este nicho ocorre principalmente sob a forma de carbono orgânico. Os teores de C em formas orgânicas (C orgânico) no solo estão diretamente relacionados à biosfera, sendo originados primariamente por meio do processo da fotossíntese ($6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O} + \text{energia} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2$) (CAMPBELL, 2000), são assimilados e posteriormente incorporados à matéria orgânica do solo (MOS) (Figura 6.1).

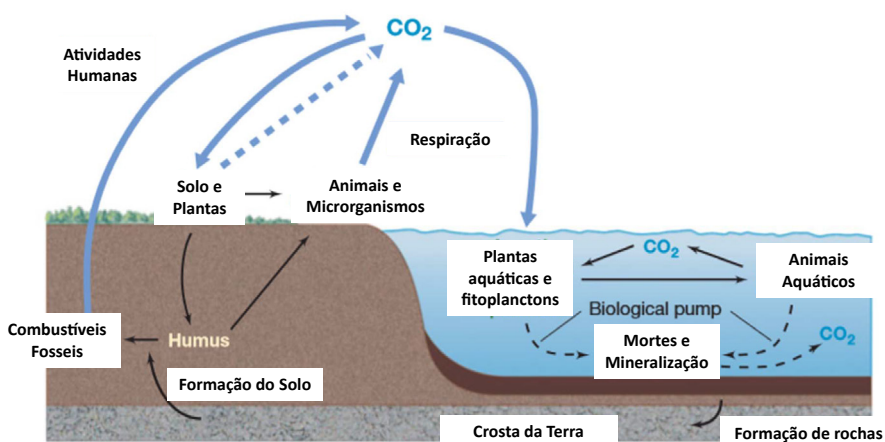


Figura 6.1 - Esquema representativo do ciclo do carbono (adaptado de MADIGAN et al, 2012).

O termo MOS se refere a todos os compostos que contêm carbono orgânico (CO), incluindo microrganismos vivos e mortos, resíduos de plantas e animais parcialmente decompostos, produtos de sua decomposição e substâncias orgânicas microbiológica e/ou quimicamente alteradas (CARDOSO et al., 1992). Esse conceito é muito abrangente, determinando uma composição extremamente complexa, em função da mistura de diferentes compostos e à grande variedade de processos naturais de degradação e síntese que ocorrem na sua formação (SILVA et al., 2010; SANTOS et al., 2008).

O carbono constitui aproximadamente 58% da composição da MOS (SILVA; MENDONÇA, 2007). Apesar de representar pequena parte (0,5 a 5%) quando comparada à fração mineral, a MOS é de suma importância para os sistemas agrícolas e florestais devido aos diversos benefícios produzidos nas propriedades químicas, físicas e biológicas do solo. Como propriedade biológica, a maioria dos organismos do solo, os quais constituem quase a totalidade da fração viva da MO, utiliza os compostos orgânicos da MOS como fonte de energia e nutrientes para a realização dos processos de transformação do C, incluindo a mineralização, imobilização e a formação de substâncias húmicas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Neste contexto, os compartimentos da MOS, incluindo teores de C, índices de biomassa microbiana e atividade enzimática no solo têm sido utilizados como indicadores da qualidade do solo. Esse termo é conceituado como a capacidade do solo em manter a produtividade biológica, a qualidade ambiental e a vida vegetal e animal saudável no sistema terrestre (DORAN; PARKIN, 1994; MIELNICZUK, 1999). Dessa forma, tais atributos do solo são utilizados por serem sensíveis ao tipo de manejo e às alterações causadas no solo, além de serem facilmente determináveis. A partir desses é possível inferir sobre a condição de determinado sistema e tomar decisões visando a minimização dos impactos negativos causados no solo.

6.2. As Transformações do Ciclo do C no Solo

As transformações do C no solo compreendem, essencialmente, duas etapas: a fixação do C-CO₂ e a regeneração, os quais são regulados por processos de oxidação do C, que regulam os fluxos de CO₂ para compostos orgânicos e destes para CO₂ e CH₄, determinando entradas

e saídas de C (Tabela 6.1), correspondendo, respectivamente, à fonte e dreno de C no sistema solo-atmosfera (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; SILVA; MENDONÇA, 2007).

A fixação do C-CO₂ atmosférico é efetuada pelos organismos fotossintéticos - plantas, algas, e bactérias autotróficas. Esta etapa finaliza-se na síntese de compostos hidrocarbonados de complexidade variável: carboidratos, hemiceluloses, celuloses, ligninas, proteínas, óleos, ácidos nucleicos e outros polímeros. Estes compostos retornam ao solo como forma de resíduos vegetais, sendo utilizados pelos organismos que regeneram o C-CO₂ durante as reações de oxidação respiratória, utilizando a energia que lhes é indispensável para manutenção e crescimento (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A regeneração corresponde às diferentes etapas de decomposição das substâncias carbonadas por meio da atuação dos microrganismos do solo. Esta etapa inicia-se pela entrada de C no solo, a qual está relacionada, principalmente, com o aporte de resíduos da biomassa aérea e radicular das plantas, liberação de exsudatos radiculares, lavagem de constituintes solúveis da planta pela água da chuva e transformação desses materiais carbonados pelos macro e microrganismos do solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Tabela 6.1 - Principais processos e mecanismos de transformações bioquímicas que regulam a ciclagem do C no sistema solo-planta-atmosfera (adaptado de MOREIRA; SIQUEIRA, 2006)

| Processo | Mecanismo | Importância |
|-----------------|--|---|
| Fotossíntese | Incorporação de C e energia | Atividade microbiana no solo |
| Decomposição | Lise macromolecular | Formação de húmus no solo |
| Mineralização | Liberação de CO ₂ e nutrientes minerais | Fertilidade do solo e concentração de CO ₂ atmosférico |

6.2.1. Decomposição da MOS

No processo de decomposição os microrganismos atuam como transformadores, enquanto os macrorganismos, representados especialmente por invertebrados macroscópicos ou microscópicos, atuam como reguladores do processo. Dessa forma, micro e macrorganismos atuam interativamente constituindo a cadeia trófica, em que os reguladores têm a função de trituradores dos materiais orgânicos, atuando como predadores e parasitas, enquanto fungos e bactérias são essencialmente decompositores primários (SANTOS et al., 2008).

A decomposição é conceituada como a quebra do material orgânico particulado, geralmente na forma de polímeros (compostos químicos de estrutura molecular complexa), em compostos solúveis que são absorvidos pelas células microbianas. Após trituração dos resíduos pelos macrorganismos, os microrganismos entram em contato com o material orgânico restante. A decomposição do material orgânico ocorre em função do grau de degradabilidade do resíduo que é relacionado à sua quantidade relativa e constituição química, o que infere sobre a recalcitrância do composto (SANTOS et al., 2008).

A fração composta por substratos prontamente decomponíveis (ou C lábil) tende a se transformar rapidamente em CO_2 e biomassa microbiana e, em seguida, são transformados os componentes químicos mais resistentes e a própria fração da nova biomassa morta. O processo perdura por meses ou anos até a completa degradação e mineralização dos constituintes orgânicos. No entanto, a decomposição de resíduos com constituição mais complexa pode distinguir estádios com diferentes características quanto à dinâmica do processo, na qual distinguem-se: frações que se decompõem rapidamente (<1 ano), frações com taxa de decomposição intermediária (<10 anos) e aquelas recalcitrantes, que praticamente não se decompõem, exigindo mais de 100 anos para se decompor (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

6.2.2. Mineralização da MOS

A ação de enzimas extracelulares sobre macromoléculas resulta na liberação de substâncias de baixo peso molecular (monômeros) durante os processos de degradação, as quais são absorvidas e metabolizadas por células microbianas, transformando-as em formas inorgânicas. Este processo procede à decomposição, constituindo-se essencialmente na

mineralização da MO, a qual ocorre simultaneamente com a imobilização de nutrientes minerais, atendendo à demanda nutricional da microbiota (Figura 6.2) (CARDOSO et al., 1992; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

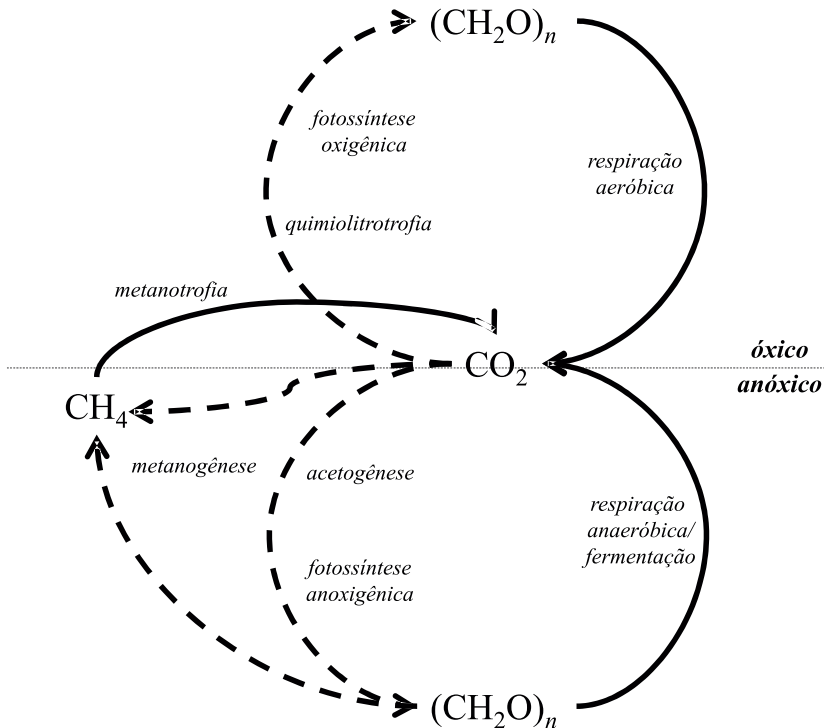


Figura 6.2 - Processos da mineralização e redução do carbono. Linhas contínuas indicam oxidações, e linhas tracejadas indicam reduções (adaptado de MADIGAN et al., 2012).

6.2.3. Produção e oxidação do metano

Um aspecto de grande importância no ciclo do C é a produção (metanogênese) e a oxidação do CH_4 (metanotrofia) no solo (Figura 6.2.). O gás metano é um dos principais gases que contribuem para o efeito estufa, tendo um potencial de armazenamento de calor (efeito estufa) trinta vezes maior do que uma molécula de dióxido de carbono (MCCAUGHEY, 1997).

O processo de metanogênese é baseado na respiração anaeróbia, que ocorre em condições muito redutoras (-200 mV), a qual resulta na produção de CH_4 , que também pode ser produzido em solos aeróbios, através de microssítios anaeróbios. Nestas condições, os microrganismos fermentadores produzem ácidos graxos, compostos aminados e aromáticos que são utilizados por redutores de H que usam estes compostos como aceptores de elétrons formando H_2 e CO_2 , os quais são utilizados pelas arqueias metanogênicas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

As arqueias metanogênicas são encontradas no filo Euryarcheota e podem ser divididas em dois grupos principais: i) *hidrogenotróficas* grupo mais comum entre as metanogênicas, constituídas de organismos quimiolitotróficos que utilizam o H_2 e o CO_2 para a produção do metano; ii) *acetoclásticas*, que utilizam o acetato resultante da degradação da matéria orgânica para a produção de metano, sendo responsáveis por cerca de dois terços da biogênese do metano produzido anualmente na Terra (ARONSON; ALLISON; HELLIKER, 2013; CONRAD, 1999; MADIGAN et al., 2012).

Para a detecção, quantificação e classificação destes microrganismos em diferentes ambientes, a utilização de métodos independentes de cultivo são muito utilizados, a região codificadora da isoenzima de *metil-coenzima M redutase* (MRT) é expressa em todos os organismos metanogênicos através do gene funcional *mcrA* (LUTON et al., 2002).

No entanto, solos agrícolas aerados podem atuar como dreno de CH_4 da atmosfera, a partir da utilização do CH_4 por bactérias metanotróficas (Figura 6.2.). As bactérias metanotróficas constituem um grupo único de microrganismos, fisiologicamente distinto por sua habilidade em utilizar o CH_4 como única fonte de C e energia com a capacidade de oxidá-lo biologicamente, proporcionando uma grande economia de energia em comparação com a assimilação de carbono por organismos autotróficos. Estas representam um importante papel no fluxo líquido de metano no sistema solo-atmosfera, formando uma barreira biológica no solo (TESSARO, 2012; COSTELLO; LIDSTROM, 1999; MADIGAN et al., 2012).

O metano é oxidado primordialmente em condições aeróbicas, porém em ambientes sem oxigênio, a oxidação do metano pode ser realizada através de um consórcio entre as arqueias metanogênicas e as bactérias redutoras de sulfato (ARONSON; ALLISON; HELLIKER, 2013; MADIGAN et al., 2012).

As bactérias metanotróficas são classificadas filogeneticamente em oito gêneros que se enquadram em duas classes, Alphaproteobacteria (possuindo o tipo II de metanotrofia) e Gammaproteobacteria (possuindo o tipo I de metanotrofia). Os tipos I e II de metanotrofia são funcionalmente distintos, sendo ativos com diferentes concentrações ótimas de oxigênio, metano e nitrogênio (HANSON; HANSON, 1996; MADIGAN et al., 2012).

De maneira geral, os organismos metanotróficos utilizam como primeiro passo para a oxidação do metano a incorporação de átomos de oxigênio em compostos de carbono, o que é realizado por meio da atividade da enzima *metano monooxigenase* (MMO). Assim, os métodos independentes de cultivo podem nos proporcionar a melhor avaliação da diversidade utilizando como marcador o gene que codifica a subunidade alfa desta enzima, o gene *pmoA* (COSTELLO; LIDSTRON, 1999).

6.3. Natureza e Biodegradação de Constituintes Orgânicos do Solo

Uma vez que a MOS se constitui na fonte energética dos organismos, além da quantidade, comumente alterada pelas práticas de manejo, a qualidade do material orgânico adicionado tem forte influência no tamanho das populações e na atividade dos organismos do solo, de modo a influenciar diferentemente a ciclagem dos nutrientes neste ambiente. Dessa forma, a decomposição dos resíduos orgânicos varia em função do potencial de assimilação dos microrganismos e de sua persistência no solo (recalcitrância do resíduo orgânico), os quais são inerentes à estrutura química das moléculas, à bioquímica no que diz respeito às enzimas e rotas de degradação e à capacidade degradadora da microbiota (CARDOSO et al., 1992; MOREIRA; SIQUEIRA 2006; SANTOS et al, 2008).

Alguns fatores relacionados à composição química dos compostos orgânicos adicionados ao solo favorecem o processo de decomposição, como o baixo teor de lignina ou de compostos fenólicos, alto teor de materiais solúveis e de nitrogênio e partículas de tamanho reduzido com baixa relação C/N. Os principais compostos químicos tidos como substratos para a microbiota são a celulose, hemicelulose e lignina, apresentados brevemente abaixo.

Celulose é o polissacarídeo de maior ocorrência natural, representando a maior parte do CO₂ fixado pelas plantas. Formada por cadeias de unidades de glicose, ligando-se ao C4 da unidade seguinte por uma ligação de glicosídeo ou ligação β-1,4. Sua decomposição no solo

ocorre por ação de enzimas (celulases) produzidas por uma vasta e diversa população fúngica (destaque para os gêneros *Trichoderma*, *Chaetomium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Phoma*) e diversas bactérias aeróbicas e anaeróbicas (DENG; TABATABAI, 1994; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Hemicelulose é um polissacarídeo constituído por arranjos de pentoses (como xilose e arabinose), hexoses (como a manose, glicose e galactose) e, algumas vezes, por ácidos urônicos (como o glucurônico e galacturônico). Exemplos de hemicelulose são as xilanas, mananas e galactanas. Muitas enzimas estão envolvidas na sua degradação, as quais são produzidas por fungos e bactérias, sendo as actinobactérias um grupo de destaque neste processo no solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Lignina é um polímero natural, derivado de grupos fenilpropanóides denominados C6 C3 ou, simplesmente, unidades C9, repetidas de forma irregular, que, têm sua origem na polimerização desidrogenativa do álcool coniferílico. As ligninas são formadas a partir de três precursores básicos, que são os álcoois p-cumarílico, coniferílico e sinapílico (BUDZIAK et al., 2004). Apresenta elevada recalcitrância em função do seu alto peso molecular e à estrutura tridimensional que confere alta estabilidade química. Ganha ainda importância neste ponto a ocorrência de anéis aromáticos compondo sua estrutura. Sua decomposição é realizada por lacases e peroxidases. A lignina em materiais ligno-celulósicos protege a celulose e a hemicelulose das enzimas que digerem os polissacarídeos, cujos monômeros entram na célula microbiana e sofrem degradação; por isso o teor deste componente se relaciona inversamente à taxa de decomposição dos materiais vegetais. A degradação da lignina no solo se dá principalmente por grupos especializados de fungos pertencentes à ordem Agaricales (Basidiomicetos) e por alguns Ascomicetos, dentre os quais os mais eficientes e mais estudados são *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete versicolor* e o *Phanerochaete chrysosporium* (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Esses componentes sofrem alterações diferenciadas no solo, por exemplo, celulose e hemicelulose são degradados rapidamente, diminuindo-se suas porcentagens em relação à da serapilheira originalmente depositada, enquanto a lignina aumenta devido à sua recalcitrância e as proteínas se acumulam devido à formação de biomassa microbiana que é rica nestes constituintes (CARDOSO et al., 1992; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

6.4. Relações do C: Imobilização e Mineralização

A contribuição da microbiota do solo na ciclagem de nutrientes, imobilizados em sua biomassa, pode ser predita por meio de suas proporções em relação às formas totais desses nutrientes. Assim como a relação C/N, as relações C/P, C/S e P/S da biomassa microbiana podem ser utilizadas para indicar como estas influenciam a disponibilidade desses nutrientes no solo. As relações mais estreitas podem resultar em maior mineralização desses nutrientes, enquanto relações mais largas podem levar à imobilização dos mesmos (Tabela 6.2) (PAUL; CLARK, 2007).

De modo geral, haverá mineralização líquida desses nutrientes quando as relações C/N, C/P e C/S forem, respectivamente, menores que 30, 200 e 300 (Tabela 6.2). Isso indica que o requerimento relativo de N pelos microrganismos é maior que o de P, que por sua vez, é maior que o de S, bastando apenas que o resíduo orgânico adicionado ao solo tenha uma relação C/N superior a 30 para que o processo de imobilização de N predomine em relação à mineralização deste nutriente. Considerando as formas de N, P e S, conclui-se que, durante o processo de mineralização de MOS, a taxa de liberação desses elementos será distinta, fazendo com que os processos de acúmulo e mineralização de C e N sejam distintos daqueles do P e S (Tabela 6.2) (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Tabela 6.2 - Relações entre C, N, P e S e a disponibilidade de nutrientes no solo (Stevenson, 1986 modificada)

| Relação | | | Imobilização (I) /Mineralização (M) | Disponibilidade dos Nutrientes | Qualidade do substrato |
|---------|---------|---------|--|-----------------------------------|---------------------------|
| C:N | C:P | C:S | | | |
| >30 | >300 | >400 | I > M | Diminuída | Pobre |
| 20-30 | 200-300 | 200-400 | I = M | Não Alterada | Intermediário |
| <20 | <200 | <200 | I < M | Aumentada | Rico |

Quando os processos de mineralização predominam em relação aos de imobilização, a MOS funcionará como fonte de nutrientes, aumentando a disponibilidade destes às plantas. Em contrapartida, quando a imobilização prevalece sobre a mineralização, a MOS passa a reter o nutriente, diminuindo sua disponibilidade para as plantas. A maior disponibilidade de substrato resulta no incremento da biomassa microbiana, a qual reflete em temporária imobilização de C (PAUL; CLARK, 2007).

6.5. Biomassa microbiana

A biomassa microbiana (BM) é a principal constituinte da MOS viva, excluídas as raízes e animais maiores que $5 \times 10 \mu\text{m}$. Corresponde a valores entre 1 e 5 % do carbono orgânico total (COT) em solos tropicais, sendo composta, principalmente, por bactérias, fungos, actinomicetos, nematóides e protozoários (STEVENSON, 1994).

Embora o número de bactérias normalmente seja superior ao de fungos, estes, pela maior massa corpórea, respondem por cerca de 60 a 80 % da biomassa microbiana. A biomassa microbiana é essencial nos processos de decomposição de resíduos, atua na estabilização de agregados do solo e na formação da MOS humificada, além de representar fonte lábil de nutrientes às culturas (DICK et al., 2009).

A biomassa microbiana atua essencialmente como agente de decomposição dos resíduos adicionados ao solo onde concorre com as plantas pelos nutrientes, podendo inclusive causar imobilização temporária, principalmente de N. Também funciona como um compartimento que libera rapidamente os nutrientes às plantas pelo processo de mineralização dos resíduos e morte dos organismos (SILVA et al., 2010), representando uma fonte lábil de nutrientes às culturas (DICK et al., 2009). Além disso, contribui para a estabilização de agregados do solo e a formação da MOS humificada ou húmus. Nos processos de decomposição e mineralização o destino inicial do C proveniente dos resíduos orgânicos é o C da biomassa microbiana, o qual pode passar posteriormente para formas mais estáveis de C no solo, sendo a maior parte perdida para a atmosfera como CO_2 (CARDOSO et al., 2011).

O C associado à biomassa microbiana representa um dos compartimentos da MOS com menor tempo de ciclagem; 2,5 anos em condições de clima temperado e 0,25 anos em condições de clima tropical úmido (SILVA et al., 2010), com tendência de a biomassa microbiana ser maior em camadas mais superficiais pela maior disponibilidade de matéria orgânica, água e outros nutrientes.

A biomassa microbiana está diretamente relacionada aos teores de MOS e à fertilidade do solo, e por isso responde rapidamente às práticas que levam ao decréscimo ou acréscimo da MOS. No sistema de plantio direto, por exemplo, a biomassa microbiana é favorecida pelo aumento do teor de MOS, em função da ausência de revolvimento do solo, pela ênfase à rotação de culturas e à implantação de vegetação de

cobertura de solo em períodos em que o solo não é utilizado para culturas comerciais (SILVA et al., 2010). Frequentemente estes fatores podem afetar o crescimento vegetal, o qual é normalmente favorecido em condições de baixo revolvimento do solo, conforme pode se visto na Figura 6.3.

Para qualquer subárea da Ciência do Solo, é interessante determinar as quantidades de C que compõem a biomassa microbiana, uma vez que este parâmetro é considerado um indicador da qualidade do solo facilmente determinado.

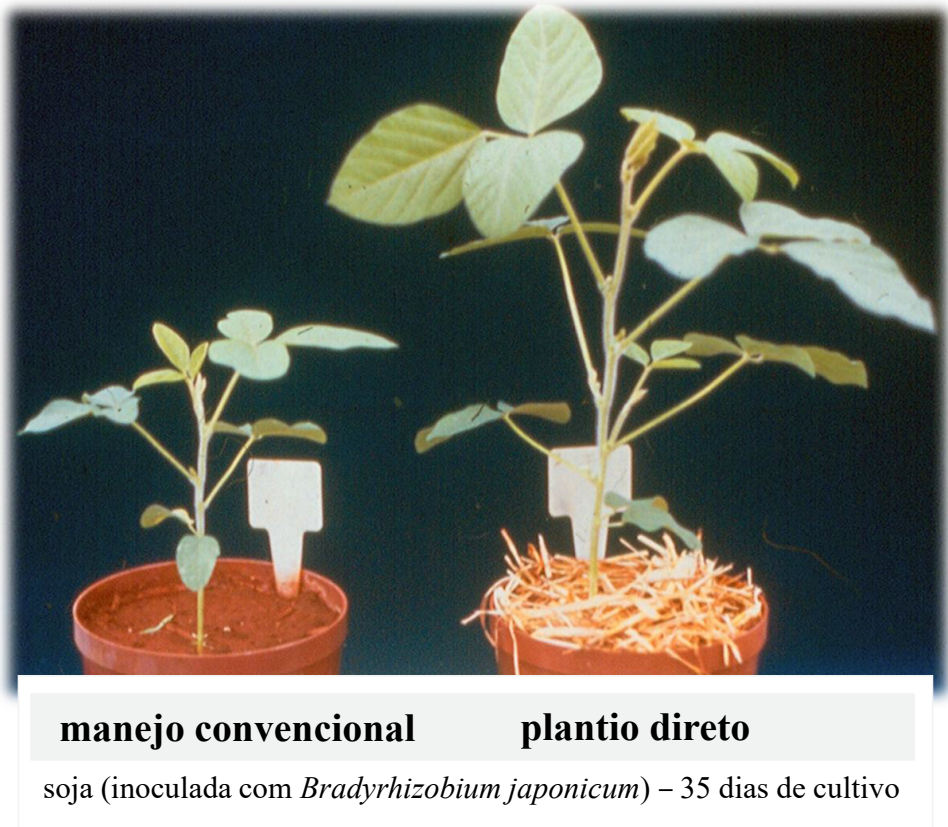


Figura 6.3 - Comparação do desenvolvimento de plantas de soja, sendo que a da esquerda foi semeada em vaso contendo solo de uma plantação de soja em sistema convencional e a da direita mostra uma planta proveniente de semeadura em solo de plantação de soja manejada em sistema de plantio direto.

6.6. Enzimas do Solo

As transformações bioquímicas no sistema solo-planta são dependentes ou relacionadas à presença das enzimas, as quais têm participação essencial nos ciclos dos elementos no solo.

As enzimas mais comumente analisadas são aquelas ligadas aos ciclos da MOS e dos macronutrientes C, N, S e P, como β -glicosidase, invertase e galactosidase, as quais desempenham papel fundamental na liberação de açúcares de baixo peso molecular, que são importantes fontes de energia imediata para os microrganismos; as celulases, responsáveis pela hidrólise da celulose, além das desidrogenases, as quais indicam o estado metabólico da biomassa microbiana, dado o seu relacionamento direto com a atividade de oxidação da MOS (TÓTOLA; CHAER, 2002).

Outras importantes enzimas envolvidas em reações de transformações no solo são as hidrolases e oxirredutases que controlam os processos de decomposição dos materiais orgânicos e transformações inorgânicas, além das transferases e liases, que se relacionam às principais catálises que ocorrem no solo. Essas quatro classes destacam-se pelas enzimas que promovem a quebra de ligações químicas, reações de oxirredução, transferências de constituintes e adição ou remoção de grupos químicos, representando a base das transformações químicas do solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Estudos relacionados ao fracionamento físico do solo indicam a predominância da atividade de várias enzimas como catalase, desidrogenase, urease e protease nas microunidades estruturais com diâmetros menores que 50 μm , indicando que a atividade enzimática apresenta forte relação com o estado de agregação do solo. Neste contexto, vale destacar que enzimas livres também podem formar complexos com colóides húmicos, estabilizando-se na superfície de partículas de argila ou da MOS (BOYD; MORTLAND, 1990), mantendo-se ativas por períodos variáveis (TÓTOLA; CHAER, 2002).

As enzimas são essenciais nos ciclos dos elementos no solo e, como são sintetizadas principalmente pelos organismos que nele crescem, as condições que favorecem a atividade microbiana, como adubação orgânica, presença de vegetação (rizosfera) e rotação de culturas, também favorecem a atividade enzimática (TABATABAI, 1994) que frequentemente se correlaciona positivamente com a produtividade ou qualidade do solo. Por esta razão e por serem muito sensíveis a mudanças

no solo (DICK et al., 1994), as enzimas são consideradas bons indicadores de qualidade do solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; TÓTOLA; CHAER, 2002; VASCONCELLOS et al., 2013)

6.7. Estudo de caso

Brandani (2013) comparou diferentes manejos do solo em cultivos de cana-de-açúcar (manejo convencional com e sem queima, adubação orgânica há quatro e 12 anos) e uma área sob vegetação nativa e quantificaram o C da biomassa microbiana (C_{BM}) pelo método de extração-fumigação conforme Vance et al. (1987). Nesse estudo, o C_{BM} mostrou ser uma variável sensível ao tipo de manejo dado ao solo, evidenciando-se para os sistemas conservacionistas (adubação orgânica e colheita sem queima) valores de C_{BM} próximos aos teores observados para a vegetação nativa (Figura 6.1). Os teores de C_{BM} variaram de 144,21 a 608,51 $\mu\text{g/g}$ de solo, observando-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre as áreas avaliadas. Considerando as áreas cultivadas com cana-de-açúcar sob diferentes manejos, o maior teor foi observado para o sistema de adubação orgânica adotado há 12 anos (506,61 $\mu\text{g/g}$ solo) e o menor para a área sob manejo com queima (144,21 $\mu\text{g/g}$ solo). Esses resultados corroboram os trabalhos de Galdos et al. (2009), Signor (2010) e Barbosa (2010), nos quais também foram observados maiores teores de C_{BM} em solos sob sistema de colheita de cana-de-açúcar sem queima.

Em relação ao manejo com adubação orgânica, Barbosa (2010) também observou que o sistema de cultivo orgânico comparado ao convencional promoveu aumentos significativos no C_{BM} , com incremento de 115 % em relação à cana sem queima e 157 % em relação à cana queimada. No entanto, o maior teor de C da biomassa microbiana foi observado para a área de mata nativa (608,51 $\mu\text{g/g}$ solo). Teores elevados de C_{BM} (618 e 401 $\mu\text{g/g}$ solo, respectivamente) também foram observados por Galdos et al. (2009) em uma vegetação nativa e por Gama-Rodrigues et al. (1997, 2005) em plantios de eucalipto.

Alguns fatores são responsáveis pelas condições mais favoráveis ao desenvolvimento microbiano em condições de vegetação natural, como o menor revolvimento do solo, a maior quantidade e qualidade de resíduos aportados ao solo, a maior quantidade de raízes e melhores condições de umidade e temperatura (FIALHO, 2006).

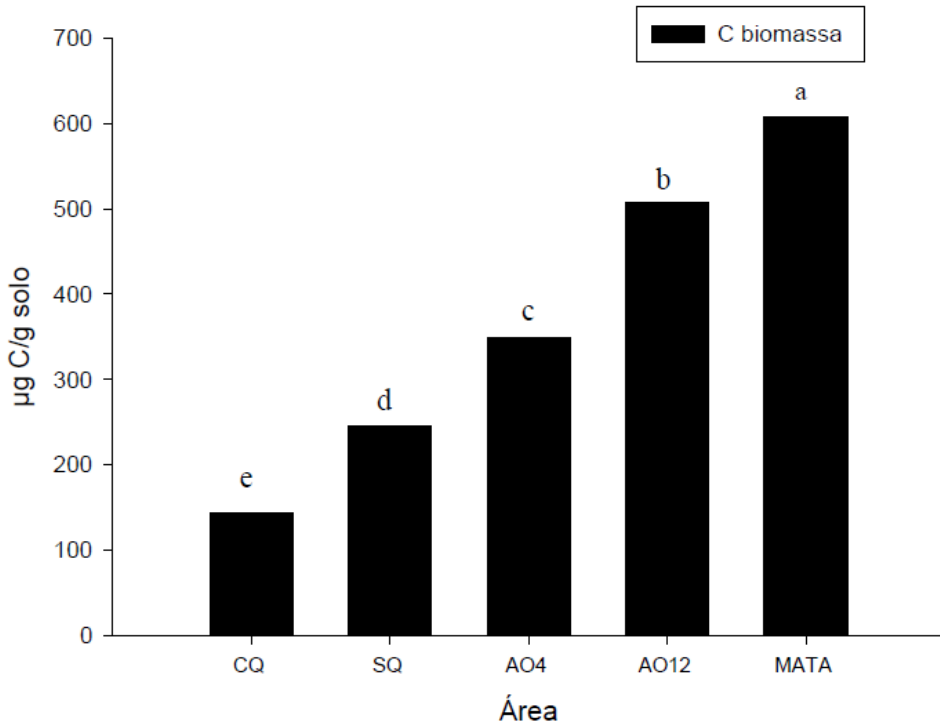


Figura 6.4 - Teores de C da biomassa microbiana em áreas cultivadas com cana-de-açúcar sob os manejos convencional com queima (CQ), convencional sem queima (SQ), adubação orgânica há quatro anos (AO4), adubação orgânica há 12 anos (AO12) e uma área de mata nativa (controle). Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Referências

ARONSON, E.; ALLISON, S.; HELLIKER, B. Environmental impacts on the diversity of methane-cycling microbes and their resultant function.

Frontiers in Microbiology, New York, v. 4, p. 1–15, 2013.

BARBOSA, L.A. **Impacto de sistemas de cultivo orgânico e convencional da cana-de-açúcar, nos atributos do solo**. 2010. 80 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

BOYD, S.A.; MORTLAND, M.M. Enzyme interactions with clays and clay-organic matter complex. In: BOLLAG, J.M.; STOTZKY, G. (Ed.). **Soil biochemistry**. New York: Marcel Dekker, 1990. v. 6, p. 1-28.

BRANDANI, C.B. **Capacidade máxima de acúmulo de carbono em solos cultivados com cana-de-açúcar**. 2013. 132 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

BUDZIAK, C.R.; MAIA, C.M.B.F.; MANGRICH, A.S. Transformações químicas da matéria orgânica durante a compostagem de resíduos da indústria madeireira. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, p. 399-403, 2004.

CAMPBELL, M.K. **Bioquímica**. 3. ed. Tradução de H.B. Ferreira. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000. 751 p.

CARDOSO, E.J.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. 360 p.

CARDOSO, E.J.B.N. et al. Recycling industrial and urban wastes in tropical agricultural soils. In: NIELSEN, C.J. (Ed.). **Recycling: processes, costs and benefits**. New York: Nova Science, 2011.

CONRAD, R. Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 28, p. 193–202, 1999.

COSTELLO, A.; LIDSTROM, M. Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 65, n. 11, p. 5066–5074, 1999.

HANSON, R.S.; HANSON, T.E. Methanotrophic bacteria. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 60, p. 439-471, 1996.

DENG, S.P.; TABATABAI, M.A. Cellulase activity of soils. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 26, p. 1347-1354, 1994.

DICK, R.P. Soil enzyme activities as indicators of soil quality. In: DORAN, J.V. et al. (Ed.). **Defining soil quality for a sustainable environment**. Madison: SSSA; American Society of Agriculture, 1994. p. 107-124.

DICK, D.P. et al. Química da matéria orgânica do solo. In: MELO, V.F.; ALLEONI, R.F. (Ed.). **Química e mineralogia do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2009. pt. 2: Aplicações, cap. 11.

DORAN, J.W.; PARKIN, T.B. Defining and assessing soil quality. In DORAN, J.W. et al. (Ed.). **Defining soil quality for a sustainable environment**. Madison: SSSA, 1994.

FIALHO, J.S. et al. Indicadores de qualidade do solo em áreas sob vegetação natural e cultivo de bananeiras na Chapada do APODI. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 37, p. 250-257, 2006.

GALDOS, M.V.; CERRI, C.C.; CERRI, C.E.P. Soil carbon stocks under and unburned sugarcane in Brazil. **Geoderma**, Amsterdam, v. 153, p. 347-352, 2009.

GAMA-RODRIGUES, E.F.; GAMA-RODRIGUES, A.C.; BARROS, N.F. Biomassa microbiana de carbono e de nitrogênio de solos sob diferentes coberturas florestais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 21, p. 361-365, 1997.

GAMA-RODRIGUES, E.F. et al. Nitrogênio, carbono e atividades da biomassa microbiana do solo em plantações de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 29, p. 893-901, 2005.

HANSON, R.S.; HANSON, T.E. Methanotrophic bacteria. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 60, n. 2, p. 439-471, 1996.

LUTON, P. et al. The mcrA gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. **Microbiology**, Washington, v. 148, p. 3521-3530, 2002.

MADIGAN, M. et al. **Brock biology of microorganisms**. 13th ed. San Francisco: Benjamin Cummings, 2012. 1155 p.

MCCAUGHEY, W. Methane production by steers on pasture. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 77, n. 3, p. 519-524, 1997.

MIELNICZUK, J. Matéria orgânica e a sustentabilidade de sistemas agrícolas. In: SANTOS, G.A.; CAMARGO, F.A.O. (Ed.). **Fundamentos da matéria orgânica do solo**. Porto Alegre: Genesis, 1999. p. 1-8.

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

PAUL, E.A.; CLARK, F.E. **Soil microbiology and biochemistry**. 3rd ed. San Diego: Academic Press, 2007. 579 p.

SANTOS, G.A. et al. **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais**. 2. ed. Porto Alegre: Metrópole, 2008. 654 p.

SIGNOR, D. **Estoque de carbono e nitrogênio e emissões de gases do efeito estufa em áreas de cana-de-açúcar na região de Piracicaba**. 2010. 75 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

SILVA, I.R.; MENDONÇA, E.S. Matéria orgânica do solo. In: NOVAIS, R.F. et al. (Ed.). **Fertilidade do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 275-374, 2007.

SILVA, R.R. et al. Biomassa e atividade microbiana em solo sob diferentes sistemas de manejo na região fisiográfica Campos das Vertentes - MG. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, p. 1585-1592, 2010.

STEVENSON, F.J. **Cycles of soil-carbon, nitrogen, phosphorus, sulphur and micronutrients**. New York: John Wiley, 1986. 380 p.

_____. **Humus chemistry: genesis, composition, reactions**. 2nd ed. New York: John Wiley, 1994. 512 p.

TABATABAI, M.A. Soil enzymes. In: WEAVER, R.W. (Ed.). **Methods of soil analysis: microbiological and biochemical properties**. 5th ed. Madison: SSSA, 1994. p. 775-833.

TESSARO, S. **Estudo da comunidade de bactérias metanotróficas em uma cronosequência de solos da Amazônia**. 2012. 82 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomedicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

TÓTOLA, M.R.; CHAER, G.M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. In: V. ALVAREZ, V.H. et al. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do solo, 2002. v. 1, p. 487-592.

VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass-C. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 19, n. 6, p. 703-707, 1987.

VASCONCELLOS, R.L.F. et al. Soil macrofauna as an indicator of soil quality in an undisturbed riparian forest and recovering sites of different ages. **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v. 58, p. 105-112, 2013.

CAPÍTULO 7

TRANSFORMAÇÕES DO NITROGÊNIO NO SOLO

Armando Cavalcante Franco Dias

7.1. Introdução

O nitrogênio é um elemento vital para qualquer organismo vivo, pois é essencial para a formação de biomoléculas, com destaque para proteínas e seus derivados (enzimas, peptídeos e aminoácidos) e ácidos nucléicos (DNA e RNA). Sua importância é tamanha que a sua demanda para a formação da biomassa do solo é somente menor do que a observada para o carbono, hidrogênio e oxigênio. Ao contemplarmos os reservatórios de N em nossa biosfera, nos deparamos com a grande quantidade deste elemento na atmosfera, onde ocorre predominantemente na forma de N_2 , o gás mais abundante do planeta, porém quimicamente inerte e não disponível para o uso direto da maior parte dos seres vivos.

Nos solos, a disponibilidade biológica do nitrogênio, juntamente com o fósforo (P), enxofre (S) e potássio (K), tem relação direta com a produtividade agrícola, sendo esses nutrientes normalmente limitantes ao desenvolvimento das plantas. Os compostos de nitrogênio solúveis e biologicamente úteis [combinações amoniacais (NH_4^+), nítricas (NO_3^-) ou orgânicas ($R-NH_2$)] são escassas nos ambientes naturais e, por essa razão, são empregados de maneira muito econômica pela maioria dos organismos

existentes nestas condições (YOUNG, 1992; RICHARDSON, WATMOUGH, 1999; NELSON; COX, 2002; JARDIM, 2011). Já em áreas agrícolas, onde a demanda por nitrogênio é maior, a correção de seus níveis é feita em solos por meio da adição do nitrogênio "combinado", via adubações químicas ou orgânicas dos solos (Van OIJEN; LEVY, 2004).

O nitrogênio está presente nos solos predominantemente sob a forma orgânica e inorgânica. As formas orgânicas do nitrogênio no solo são componentes da matéria orgânica do solo, sendo este elemento encontrado em grandes quantidades principalmente na fração proteica da matéria orgânica, a qual é passível de grande rapidez de mineralização. Na forma inorgânica, o nitrogênio assume diferentes formas nos solos, sendo este o elemento encontrado sob formas inorgânicas mais diversas no solo. Destacam-se entre estas formas sua ocorrência como amônio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-), óxido nitroso (N_2O) dentre outras.

7.2. A Ciclagem do nitrogênio no solo

Esta grande variabilidade de formas inorgânicas em que o nitrogênio se apresenta no sistema solo dá a este elemento uma ciclagem composta de diversas transformações, promovidas pela ação direta de microrganismos e plantas, que são de grande importância no ambiente, dando suporte aos mais diversos metabolismos, e contribuindo para a manutenção do sistema solo.

Apesar de extremamente abundante na atmosfera, o nitrogênio é frequentemente o nutriente mais limitante do crescimento das plantas e isto acontece porque as plantas apenas conseguem usar o nitrogênio sob as formas de amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-). Dessa forma, entender a ciclagem deste nutriente, e o efeito do manejo dos solos sobre este elemento dá base ao adequado uso do nitrogênio nos solos (CARDOSO et al., 1992).

O ciclo do nitrogênio se divide em diversas etapas (Figura 7.1), sendo que neste capítulo serão abordadas aquelas de maior importância no ambiente solo, que são a fixação biológica do nitrogênio, a amonificação, a nitrificação e a desnitrificação. A Tabela 7.1 resume estas transformações, bem como indica alguns grupos microbianos conhecidamente envolvidos na realização de cada uma destas etapas.

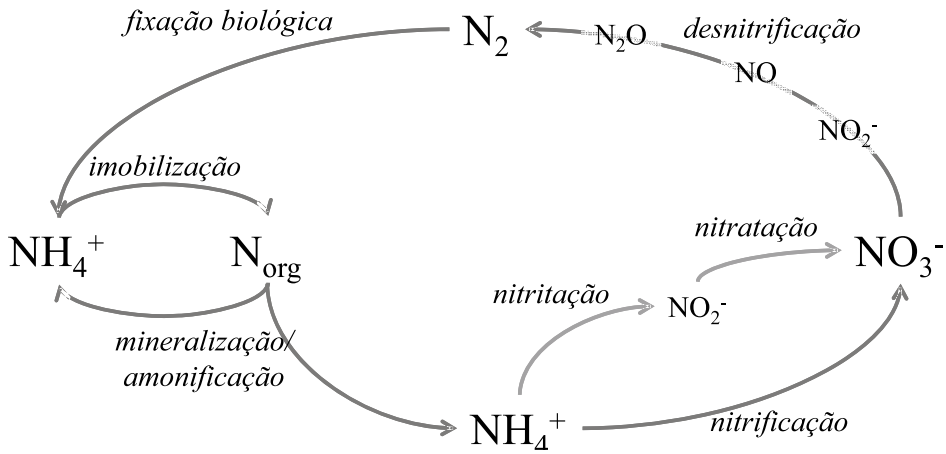


Figura 7.1 - Esquema representativo das transformações do nitrogênio nos solos.

Tabela 7.1 - Esquemas das etapas dos ciclos, suas respectivas conversões e os principais microrganismos responsáveis por cada etapa do ciclo do nitrogênio

| Etapas | Fórmula | Microrganismos |
|-----------------------|---|---|
| Fixação do Nitrogênio | $N_2 \rightarrow NH_3$ | Bactérias diazotróficas (<i>Actinobacteria</i> , <i>Clostridia</i> , <i>Cyanobacteria</i> e <i>Proteobacteria</i>). |
| Nitrificação | $NH_4^+ \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO_3^-$ | AOB – Bactérias oxidantes de amônia AOA – Arquéias oxidantes de amônia |
| Desnitrificação | $NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$ | Bactérias, arqueias e alguns eucariotos |

7.2.1. A fixação biológica do nitrogênio

A entrada do nitrogênio no solo é dada principalmente pelo processo conhecido como fixação de nitrogênio. Apenas alguns procariontos são capazes de fixar nitrogênio atmosférico, sendo os principais as cianobactérias, que habitam os solos e as águas salgadas e doces,

outras espécies de bactérias de vida livre no solo, e ainda bactérias simbiotes, por exemplo, as que vivem nos nódulos de raízes de plantas leguminosas (DIALLO et al., 2004; JOHNSTON; LI; OGILVIE, 2005; ZHER et al., 2003). Como este tema será mais amplamente abordado nos capítulos 8 e 9, este assunto será apresentado aqui de forma resumida.

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) envolve a redução do nitrogênio atmosférico N_2 a amônia, sendo esta capacidade ligada à presença e atividade do complexo enzimático altamente conservado entre os fixadores de N conhecido como nitrogenase (SARITA et al., 2008). A FBN é importante para a produção de nitrogênio fixado em muitos habitats terrestres e aquáticos (ARP et al., 2000).

7.2.2. Amonificação

A amonificação, ou mineralização do N orgânico é o processo pelo qual formas de N orgânicas são transformadas para formas minerais, sendo o primeiro composto gerado neste processo o amônio (Figura 7.1). A amonificação é realizada por um grande número e uma ampla diversidade de microrganismos, caracterizada como um processo de alta redundância funcional, porém presente em todos os ambientes nos quais ocorre a vida.

A amonificação ocorre tanto em condições aeróbias quanto nas anaeróbias, com temperaturas variadas e mediante muitas outras variações nos atributos físicos, químicos ou climáticos do solo. Contudo, este processo é geralmente favorecido em ambientes aeróbios, com temperaturas mesófilas, pH neutro a ligeiramente ácido ou alcalino, além de, obviamente, boa disponibilidade de material orgânico biodegradável.

O amônio gerado a partir do processo de amonificação segue dois caminhos no solo: ou é submetido a transformações inorgânicas posteriores, ou é absorvido como nutriente pelas plantas e microrganismos do solo, no processo chamado de imobilização. Portanto, a imobilização é o processo inverso da amonificação, sendo o amônio convertido a N orgânico, e compondo a biomassa microbiana do solo (CARDOSO et al., 1992).

7.2.3. Nitrificação

A nitrificação é o processo pelo qual passa o amônio não assimilado como nutriente no solo. Neste processo, o amônio é submetido a uma oxidação que tem como produto final o nitrato (NO_3^-) (Figura 7.1). O processo da nitrificação consiste em duas etapas, sendo que inicialmente ocorre a oxidação de amônia para nitrito (NO_2^-), realizada pelos microrganismos oxidantes de amônia (bactérias e arqueias); posteriormente ocorre a oxidação do nitrito para nitrato, realizada pelas bactérias oxidantes de nitrito (NOB). (PROSSER, 1989; TESKE et al., 1994, TREUSCH et al., 2005). Recentemente, um novo grupo aeróbico de oxidadores de amônia foi descrito por meio da detecção de genes codificadores de enzimas amônio oxidantes em DNA de origem arqueana, encontrados em bibliotecas metagenômicas (SCHLEPER et al., 2005). Posteriormente, foi verificado por meio de cultivo enriquecido, que uma linhagem de Archaea oxida amônia (AOA) a nitrito, por uma via aparentemente semelhante à conhecida nas bactérias oxidantes de amônia (AOB) (KÖNNEKE et al., 2005). Atualmente acredita-se que as AOA são muito mais abundantes do que AOB em sistemas marinhos (WÜCHTER et al., 2006), sendo também predominantes em solos (LEININGER et al., 2006). A oxidação da amônia é considerada o passo limitante da velocidade da nitrificação na maioria dos sistemas, pois o nitrito raramente acumula-se no meio ambiente. Além disso, o processo da nitratação ocorre mais rapidamente do que o da nitrificação, o que também contribui para a não-acumulação do nitrito no solo.

A nitrificação demanda oxigênio, de modo que ela só pode acontecer em ambientes ricos em oxigênio, tais como as camadas mais superficiais dos solos, e predominantemente em solos menos argilosos. Por ser um processo realizado por uma pequena diversidade de organismos, este processo é ainda severamente restritivo em relação às demais condições para sua ocorrência. Por exemplo, as temperaturas ótimas para ocorrência da nitrificação estão entre 25 e 30°C, e o pH ótimo oscila entre 6,6 e 8,0 (pelo menos para a nitrificação bacteriana em solos de clima temperado).

O processo de nitrificação tem consequências importantes. Os íons de amônio (NH_4^+) são carregados positivamente e, portanto, se combinam com as partículas de argila e de matéria orgânica dos solos (negativamente carregadas) num processo físico denominado sorção. Essa carga positiva da amônia evita que ela seja lixiviada do solo pela chuva. Por outro lado, os íons nitrato (NO_3^-), carregados negativamente, não são capturados

pelas partículas de argila ou matéria orgânica (também negativamente carregadas) e são, portanto, lixiviados para todo o perfil do solo, o que leva a um decréscimo da fertilidade dos solos, e consequente enriquecimento de nitrato dos níveis mais profundos dos solos e das águas subterrâneas (GUJER, 2010), o que é altamente indesejado.

7.2.4. Desnitrificação

O retorno do nitrogênio para a atmosfera acontece por meio da desnitrificação, que é a redução de nitrato a nitrogênio atmosférico (Figura 7.1) (CABELLO et al., 2004; PHILIPPOT, 2002; WALLENSTEIN et al., 2006).

O processo é realizado por organismos pertencentes a diferentes grupos taxonômicos distribuídos entre bactérias, arqueias e eucariotos. No entanto, a maior parte dos organismos descritos como desnitrificadores são afiliados ao filo Proteobacteria (Divisões Alfa, Beta, Gama e Epsilonproteobacteria) (GREEN et al., 2010; HAYATSU et al., 2008; KERN; EINSLE; SIMON, 2009). Resumidamente, a desnitrificação é um processo respiratório, no qual o nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), óxido nítrico (NO) e óxido nitroso (N_2O), sucessivamente, são utilizados por microrganismos como aceptores finais de elétrons durante o processo respiratório produzindo gás nitrogênio (N_2). Esta via é considerada a maior causa de perda de nitrogênio na agricultura, sendo que parte significativa desta perda se dá na forma de produção de N_2O , gás que tem enorme potencial de efeito estufa (296 vezes maior do que o CO_2). Esta transformação é ainda utilizada para remover o excesso de nitrogênio da água no tratamento de esgotos (TIEDJE, 1982).

No total, sete enzimas são responsáveis por catalisar as quatro etapas redutoras da desnitrificação (PHILIPPOT, 2002). A redução do nitrato para nitrito é catalisada pelas redutases Nar ou Nap e constituem a primeira etapa desta via. A etapa que define a desnitrificação é a redução do NO_2^- solúvel ao gás NO, catalisada por uma das duas nitrito-redutases, NirK ou NirS. A etapa posterior é a redução do NO a N_2O , promovida pelas óxido-nítrico-redutases cNor ou qNor, codificadas por duas variantes do mesmo gene, o *norB* (ZUMFT, 2005). A etapa final da desnitrificação é a conversão do N_2O para N_2 . A única enzima conhecida por catalisar esta reação é a óxido nitroso-redutase (Nos). Esta etapa é a responsável pelo retorno do nitrogênio à atmosfera, onde o gás N_2 pode agora ser novamente convertido a formas assimiláveis de nitrogênio por

meio da ação de organismos fixadores de nitrogênio e nitrificantes (KRAFT; STROUS; TEGETMEYER, 2010). Em bactérias, a desnitrificação é um processo alternativo à respiração oxigênica, e ocorre em condições de baixo teor de oxigênio ou anóxicas, ou seja, a desnitrificação corresponde à respiração anaeróbia em solos que apresentem Eh entre 100 e 300 mV e somente ocorre na presença de material orgânico energético (CARDOSO et al., 1992).

7.2.5. Outros processos dentro do ciclo do nitrogênio

Outros dois processos ocorrem dentro da gama de transformações de nitrogênio no solo, porém ainda são pouco compreendidos em sua plenitude, bem como em sua relevância para o manejo do N nas áreas de cultivo.

O acoplamento dos processos de nitrificação e desnitrificação, também chamado de nitrificação desnitrificadora, se dá no momento em que o NO_2^- gerado na nitrificação é levado ao processo de redução, e não oxidado a NO_3^- . Este processo ocorre em ambientes com uma menor disponibilidade de O_2 , e é intermediado por grupos bacterianos desnitrificadores. Em áreas de cultivo, este processo pode ser grande responsável pela emissão de N_2O (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A oxidação anaeróbica do íon amônio (anammox) é realizada por algumas espécies pertencentes ao filo Planctomycetes, numa transformação essencial para este elemento em condições de anaerobiose e/ou baixa disponibilidade de oxigênio. Este processo consiste na oxidação do íon amônio a N_2 com a utilização de nitrito como receptor final de elétrons (MULDER et al., 1995; STROUS et al., 1999), mediado por bactérias de cinco gêneros, todos Candidatus e de difícil cultivo (*Scalindua*, *Brocadia*, *Kuenenia*, *Anammoxoglobus* e *Jettenia*) (SCHMID et al., 2005; HUMBERT et al., 2009).

7.3. Considerações Finais

O nitrogênio é um componente vital na estrutura e na composição de proteínas e ácidos nucleicos, biomoléculas essenciais para a manutenção da vida. Esse elemento apresenta diferentes formas oxidativas na natureza, sendo o seu processo de renovação resultado de alterações entre os estágios oxidativos. O ciclo do nitrogênio é o processo

pelo qual o elemento é renovado entre os diferentes componentes da biosfera, por meio de reações de óxido-redução sequenciais, envolvendo a participação de diferentes organismos, sendo os procariotos essenciais para a ocorrência do ciclo. Mais de 99% do nitrogênio da superfície da Terra está disponível na forma de gás N_2 , que é indisponível para o uso direto pela maioria dos seres vivos, havendo a necessidade de este gás ser reduzido a amônio, a fim de ser assimilado pelos organismos para a síntese de proteínas. Esse processo de redução do gás nitrogênio a amônio é conhecido como fixação biológica do nitrogênio e é a principal porta de entrada do nitrogênio no sistema. A devolução do nitrogênio à atmosfera, na forma de N_2 , é feita graças à ação de bactérias chamadas desnitrificantes. Elas podem transformar os nitratos do solo em N_2 , que volta à atmosfera, fechando o ciclo.

7.4. Estudo de Caso

A entrada e manutenção do nitrogênio no solo são processos desejados desde que estes não tenham impacto negativo sobre o ambiente. Sabe-se ainda, que os possíveis impactos que este nutriente pode causar quando adicionado/transformado de maneira inadequada são condicionados ao tipo de solo em questão. Com base nisso, este estudo visa atender à demanda de um grupo de consultores que necessitam entender melhor o processo de perdas de nitrogênio em solos arenosos e argilosos, além de ligar a este conhecimento o papel microbiano nestas transformações do nitrogênio em ambos os solos. Destaque os processos predominantes em cada solo, e discuta os pontos críticos para o manejo do N do ponto de vista ambiental.

Referências

ARP, D.J. The nitrogen cycle. In: TRIPLETT, E.W. (Ed.). **Prokaryotic nitrogen fixation**. Wyomndham: Horizon Scientific Press, 2000. p. 1–14.

CABELLO, P.; ROLDAN, M.D.; MORENO-VIVIAN, C. Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea. **Microbiology**, Reading, v. 150, p. 3527–3546, 2004.

CARDOSO, E.J.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. 360 p.

DIALLO, M.D. et al. Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the N₂-fixing bacterial diversity in soil under *Acacia tortilis* ssp. *Raddiana* and *Balanites aegyptiaca* in the dryland part of Senegal. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 6, p. 400–415, 2004.

GREEN, S.J. et al. Denitrifying bacteria isolated from terrestrial subsurface sediments exposed to mixed-waste contamination. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, p. 3244–3254, 2010.

GUJER, W. Nitrification and me: a subjective review **Water Research**, Amsterdam, v. 44, p. 1–19, 2010.

HAYATSU, M.; TAGO, K.; SAITO, M. Various players in the nitrogen cycle: diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. **Soil Science and Plant Nutrition**, London, v. 54, p. 33–45, 2008.

HUMBERT, S. et al. Molecular detection of anammox bacteria in terrestrial ecosystems: distribution and diversity. **The ISME Journal**, New York, v. 4, p. 450–454, 2009.

JARDIM, W.F.; CHAGAS, A.P. A química ambiental e a hipótese Gaia: uma nova visão sobre a vida na terra? **Química Nova**, São Paulo, v. 15, p. 73–76, 2011.

JOHNSTON, A.W.B.; LI YOUGUO; LESLEY, O. Metagenomic marine nitrogen fixation: feast or famine? **Trends in Microbiology**, Amsterdam, v. 13, n. 9, p. 416–420, 2005.

KERN, M.; EINSLE, O.; SIMON, J. Variants of the tetrahaem cytochrome c quinol dehydrogenase NrfH characterize the menaquinol-binding site, the haem c binding motifs and the transmembrane segment. **Biochemical Journal**, Portland, v. 414, p. 73–79, 2008.

KONNEKE, M. et al. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. **Nature**, London, v. 437, p. 543–546, 2005.

KRAFT, B.; STROUS, M.; TEGETMEYER, H.E. Microbial nitrate respiration: genes, enzymes and environmental distribution. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 155, n.1, p. 1–14, 2011.

LEININGER, S. et al. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. **Nature**, London, v. 442, p. 806-809, 2006.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: Ed. UFLA, 2006. 729 p.

MULDER, A. et al. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. **FEMS Microbiology and Ecology**, Amsterdam, v. 16, p. 177–184, 1995.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger princípios de bioquímica**. Tradução de A.A. Simões e W.R.N. Lori. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

PHILIPPOT, L. Denitrifying genes in bacterial and Archaeal genomes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Gene Structure and Expression**, Oxford, v. 1577, p. 355–376, 2002.

PROSSER, J.I. Autotrophic nitrification in bacteria. **Advances in Microbial Physiology**, Oxford, v. 30, p. 125–181, 1989.

RICHARDSON, D.J.; WATMOUGH, N.J. Inorganic nitrogen metabolism in bacteria. **Current Opinion in Chemical Biology**, Oxford, v. 3, p. 207–219, 1999.

SARITA, S. et al. Diversity of *nifH* gene amplified from rhizosphere soil DNA. **Current Science**, Bangalore, v. 94, p. 109-114, 2008.

SCHLEPER, C.; JURGENS, G.; JONUSCHEIT, M. Genomic studies of uncultivated archaea. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, p. 479–488, 2005.

SCHMID, M.C. et al. Biomarkers for in situ detection of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 1677–1684, 2005.

STROUS, M. et al. Missing lithotroph identified as new Planctomycete. **Nature**, London, v. 400, p. 446-449, 1999.

TESKE, A. et al. Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 176, n. 6, p. 623–630, 1994.

TIEDJE, J.M. et al. Denitrification: ecological niches, competition and survival. **Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology**, Dordrecht, v. 48, p. 569–583, 1982.

TREUSCH, H. ET AL. Novel genes for nitrite reductase and Amo related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 7, p. 1985–1995, 2005.

van OIJEN, M.; LEVY, P.E. Nitrogen metabolism and plant adaptation to the environment - the scope for process-based modelling. In: AMÂNCIO, S.; STULEN, I.D.H.J. (Ed.). **Nitrogen acquisition and assimilation in higher plants**. Amsterdam: Kluwer Academic, 2004. p. 133-147.

WALLENSTEIN, M.D. et al. Environmental controls on denitrifying communities and denitrification rates: insights from molecular methods. **Ecological Applications**, New York, v. 16, p. 2143–2152, 2006.

WÜCHTER, C. et al. Archaeal nitrification in the ocean. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 33, p. 12317–12322, 2006.

YOUNG, J.P.W. Phylogenetic classification of nitrogen fixing bacteria. In: STACEY, G.; BURRIS, R.; EVANS, H. (Ed.). **Biological nitrogen fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992. p. 43–86.

ZEHR, J.P. et al. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 5, n. 7, p. 539–554, 2003.

ZUMFT, W.G. Cell biology and molecular basis of denitrification. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 61, p. 533–616, 2005.

CAPÍTULO 8

FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO SIMBIÓTICA

Alice de Sousa Cassetari, Mylenne Calciolari Pinheiro da Silva, Elke JBN Cardoso

8.1. Introdução

O nitrogênio (N) é um elemento essencial para os organismos vivos, constituinte de moléculas como aminoácidos, proteínas, ácidos nucléicos, bases nitrogenadas e clorofila (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). É um dos nutrientes mais limitantes para o crescimento vegetal e produção agrícola. No entanto, 98% do nitrogênio existente no planeta encontram-se indisponíveis e podem estar localizados em rochas, oceanos e sedimentos. Os 2% disponíveis estão num ciclo dinâmico, envolvendo a atmosfera, lagos, rios, plantas e animais (WILLIAMS; MILLER, 2001). O principal reservatório deste elemento na natureza é a atmosfera (78%). Porém, este compartimento encontra-se indisponível para a maioria dos organismos vivos. Para que o N atmosférico possa ser utilizado pelas plantas e animais, é necessário que ele seja reduzido para formas assimiláveis.

O N₂ pode ser fixado naturalmente mediante descargas elétricas na atmosfera e, de forma artificial, através de processo industrial para produção de fertilizantes, conhecido como processo Haber-Bosch, considerado uma

das principais invenções no século XX (SMIL, 1999), porém há a necessidade de grande gasto de energia na forma de altas temperaturas e pressões para quebrar a tripla ligação que une as moléculas de N. Já o processo biológico contribui com a maior parte do nitrogênio fixado atualmente no planeta, sendo que a quebra da tripla ligação ocorre a pressões e temperaturas ambientes, por meio de atividade enzimática, (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006) podendo fixar cerca de 150 milhões de toneladas de nitrogênio por ano. E este processo é promovido biologicamente por meio de uma pequena parcela de procaríotos que possuem a enzima nitrogenase, capaz de reduzir o N-atmosférico à amônia, no processo que é conhecido como fixação biológica do nitrogênio (FBN), representado na equação abaixo:



A FBN possui grande importância no aspecto econômico e ecológico, tanto em sistemas agrícolas como florestais (REIS; TEIXEIRA, 2005). Os microrganismos responsáveis por esta transformação são conhecidos como diazotróficos e pertencem aos domínios *Bacteria* e *Archaea*. Devido a sua grande diversidade, são encontrados nos mais diferentes tipos de habitats. A maioria de suas espécies é de vida livre, com ocorrência em todos os tipos de solo, rizosfera e filosfera, águas doces e salgadas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Algumas destas fixadoras fazem simbiose com diferentes espécies vegetais, ou estabelecem relações menos especializadas com plantas, sendo denominadas de associativas (DÖBEREINER; ALVAHYDO, 1959). Outras podem ter períodos em que crescem na rizosfera e no rizoplano, seguidos de períodos em que se localizam internamente na planta formando estruturas hipertróficas, denominadas nódulos em suas raízes (CARDOSO, TSAI; NEVES, 1992). As bactérias fixadoras de nitrogênio que são capazes de formar os nódulos fazem associação com leguminosas, e são popularmente conhecidas como rizóbios. Estes microrganismos pertencem à classe *Alphaproteobacteria* (ordem *Rhizobiales*, gêneros *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*) (YOUNG, 1996). Esta associação é considerada uma das simbioses mais eficientes do ponto de vista evolutivo e este grupo de bactérias é provavelmente responsável pela maior parte de fluxo de nitrogênio fixado biologicamente no planeta (KAHINDI et al., 1997).

Recentemente, verificou-se que algumas Leguminosas arbóreas encontradas em regiões tropicais, principalmente aquelas provenientes da América Latina, têm como microssimbionte bactérias do gênero *Burkholderia*, da classe *Betaproteobacteria*, que são responsáveis pela fixação do nitrogênio em Mimosaceae e grupos afins da América do Sul. Entretanto, no México, predominam espécies de *Mimosa* que nodulam com Alfaproteobactérias, mais especificamente as Rizobiaceas e, entre elas, também o gênero *Ensifer* (CHEN, WEN-MING et al., 2006; LAMMEL, et al., 2007, 2015; ZGADZAJ et al., 2015).

A FBN tem um papel fundamental na sustentabilidade dos ecossistemas, já que o nitrogênio de origem biológica está prontamente disponível para as plantas e é, portanto, menos susceptível a perdas por lixiviação, volatilização ou desnitrificação. Neste capítulo serão abordados temas sobre a comunidade microbiana simbiótica, mostrando como é formada a associação entre rizóbios e leguminosas e qual sua importância para a agricultura e o ecossistema.

8.2. Importância e Papel das Leguminosas

A família botânica *Leguminosae* (*Fabaceae*) compõe um grupo numeroso de espécies de importância econômica e ecológica. É a terceira maior família de plantas com flores, somente sendo superada pelas *Orchidaceae* e *Asteraceae* (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Segundo estimativas, a biodiversidade das leguminosas alcança valores em torno de 727 gêneros e 19.325 espécies, sendo que 15% destas são encontradas em ecossistemas brasileiros (SOUZA; AGUIAR, 2009).

Uma das características marcantes dessa família é a capacidade de formar simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio, resultando em nódulos nas raízes. A forma dos nódulos é uma propriedade particular de cada planta hospedeira e as diferenças morfológicas dos nódulos mostra uma possível relação evolutiva diferenciada dentre as leguminosas (CORBY, 1981). Importante ressaltar que as leguminosas variam entre altamente específicas ou altamente promíscuas, podendo estabelecer simbiose com apenas uma espécie de bactéria ou com uma grande variedade delas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006), sendo esta outra característica marcante de cada espécie.

Devido a essas associações com bactérias fixadoras de nitrogênio, as leguminosas podem contribuir de forma efetiva para melhoria da

qualidade do solo e crescimento vegetal. Elas apresentam teores de nitrogênio elevados em seus tecidos, resultando então em um aumento de nutrientes e matéria orgânica no solo em que se desenvolvem (FRANCO et al., 1995). Por esse motivo, é umas das principais famílias vegetais plantadas quando se tem o objetivo de recuperar áreas degradadas.

As leguminosas também apresentam espécies importantes que podem ser cultivadas em consórcios com Gramineas em pastagens. As gramíneas podem se beneficiar do N_2 fixado pela leguminosa, seja diretamente por meio da excreção de compostos nitrogenados pelas raízes, ou indiretamente por meio da deposição de nutrientes absorvidos do solo e depositados na camada superficial do solo após a decomposição da serapilheira e das raízes.

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) também podem trazer inúmeros benefícios para as leguminosas e podem ter efeito direto sobre a nodulação. O principal papel do fungo é o fornecimento de fósforo (P) para a planta hospedeira e o suprimento da alta demanda desse nutriente para os nódulos. O processo de FBN é altamente exigente em energia na forma de ATP, de modo que o adequado suprimento de P proporcionado pelo FMA beneficia esse processo (CARDOSO, 1986; BAREA et al., 1992). Segundo Jesus et al. (2005), em algumas espécies de leguminosas arbóreas tropicais, a micorrização tem papel importante para a nodulação, sendo que sua ausência pode dificultar a formação dos nódulos e, conseqüentemente, impedir que as bactérias fixadoras de N expressem seu potencial ao favorecer um melhor desenvolvimento das plantas (LAMMEL et al., 2015).

8.3. Nodulação

Os rizóbios são bactérias que durante a simbiose localizam-se em estruturas especializadas, os nódulos, que são formados nas raízes de leguminosas, característica típica desta interação. O processo de formação de nódulos em leguminosas requer o reconhecimento específico entre rizóbios e leguminosa, envolvendo um complexo mecanismo de sinalização e transdução de sinais moleculares (Figura 8.1).

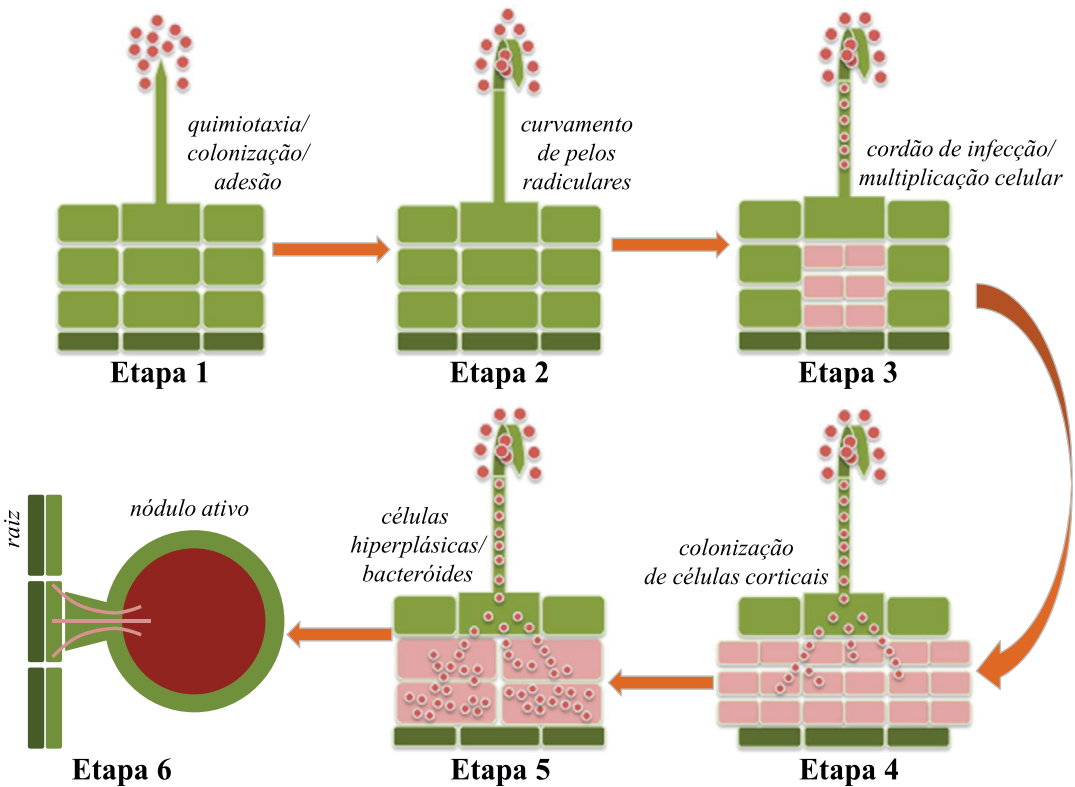


Figura 8.1 - O nódulo é composto de uma região central infectada e do córtex externo. A região vascular da raiz liga-se ao nódulo.

O primeiro passo deste processo é a liberação de flavonóides e isoflavonóides pelas raízes das leguminosas, os quais serão reconhecidos pelas bactérias diazotróficas e ativarão a expressão de genes de nodulação (*nod*, *noe*, *nol*), presentes de forma específica nestas bactérias (DEBELLÉ et al., 2001). Os genes de nodulação estão envolvidos na síntese dos chamados fatores de nodulação (Fator Nod), que são lipoquitooligossacarídeos (LQO) essenciais para a formação dos nódulos e determinantes da especificidade da planta hospedeira. A liberação dos fatores de nodulação pelas bactérias irá induzir as diversas modificações nas raízes das leguminosas, resultando na curvatura dos pelos radiculares (Figura 8.1), alcalinização do meio extrarradicular, oscilação na

concentração de Ca^+ , formação do cordão de infecção e do primórdio nodular (EHRHARDT et al., 1992). Os mecanismos que podem afetar a troca de sinalização entre bactéria e planta ainda estão sendo investigados, como condições do solo, temperaturas extremas, pH alto ou baixo no solo, presença de pesticidas, deficiência de nutrientes, presença de nitrogênio mineral no solo entre outros (HUNGRIA; VARGAS, 2000). Além disso, o reconhecimento dos fatores Nod pelas leguminosas resulta também na indução da expressão de genes vegetais que codificam nodulinas, proteínas essenciais para a formação dos nódulos (GOVERS et al., 1986; GLOUDEMANS; BISSELING, 1989).

De acordo com o padrão de expressão, as nodulinas são classificadas como precoces ou tardias. As nodulinas precoces são expressas imediatamente após o contato da bactéria com a planta e estão envolvidas na formação da estrutura nodular. Já as nodulinas tardias são expressas em nódulos maduros e são responsáveis pelo metabolismo e manutenção dos nódulos (STOUGAARD, 2000). A nodulina tardia mais abundante nos nódulos é a leg-hemoglobina, responsável pela difusão do oxigênio no interior dos nódulos, para que este não iniba a atividade da nitrogenase.

Neste último momento do estabelecimento da simbiose, também estão envolvidas enzimas responsáveis pelo processo de assimilação do nitrogênio e conversão de NH_4^+ a aminoácidos, como a glutamina sintetase e a glutamato sintetase (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Uma abordagem interessante desse mecanismo é o estudo da expressão de genes que são ativados ou suprimidos em determinadas condições ambientais e em diferentes estádios de desenvolvimento do nódulo nas leguminosas, no intuito de determinar suas funções e melhor explorar o potencial das bactérias fixadoras de nitrogênio associadas às leguminosas.

8.4. A enzima nitrogenase

Apesar de as bactérias diazotróficas terem a capacidade de habitar diferentes ambientes, todas utilizam a mesma maquinaria bioquímica para realizar a fixação biológica do nitrogênio, a enzima nitrogenase (Figura 8.2.). Ela é responsável por catalisar o processo de redução do N-atmosférico a N-amoniacal (N-combinado), forma assimilável pelos seres vivos. Através de vários estudos, estabeleceu-se a existência de sistemas alternativos da nitrogenase, geneticamente independentes: nitrogenase 1, dependente

de molibdênio (Mo) e ferro (Fe) e codificada por genes *nif*; nitrogenase 2, dependente de Vanádio (V) e codificada por genes *vnf* e nitrogenase 3, dependente de Ferro (Fe) e codificada por genes *anf* (REIS; TEIXEIRA, 2005; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

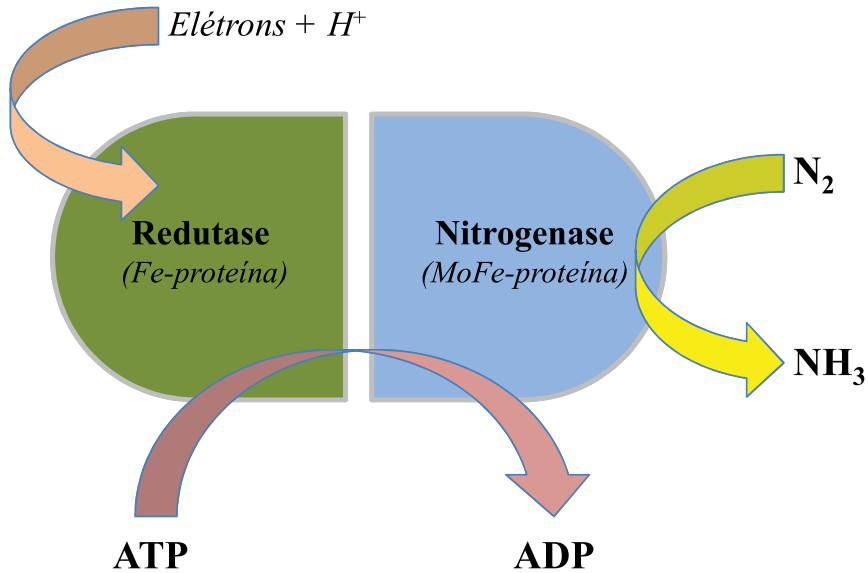


Figura 8.2 - O complexo enzimático da nitrogenase e o seu funcionamento.

A fisiologia dos micro-organismos diazotróficos é marcada pelas propriedades inerentes da nitrogenase, como: presença de seus componentes estruturais ferro (Fe), molibdênio (Mo) ou vanádio (V), MgATP para sua atividade, suprimento adequado de poder redutor (a flavodoxina e a ferredoxina), além de um ambiente em que não haja disponibilidade de N-combinado (REIS; TEIXEIRA, 2005). A nitrogenase é considerada extremamente versátil e, além de catalisar a redução do N-atmosférico a N-combinado, também é capaz de reduzir prótons a hidrogênio e pequenas moléculas insaturadas como acetileno, azida e cianeto a formas mais reduzidas (KIM; REES, 1992).

Neste contexto, a técnica de redução do acetileno para etileno (ARA) possui certa importância nos estudos de sistemas fixadores. É um método que já foi bastante utilizado para determinar o caráter diazotrófico das bactérias, através da detecção da presença da atividade da enzima e ainda em voga para certas análises. Esta técnica utiliza cromatografia gasosa para medir a redução do acetileno a etileno. É considerada bastante sensível, de baixo custo, fácil condução e relativamente rápida (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A técnica é utilizada para estudos qualitativos (presença ou ausência da enzima), ou avaliações quantitativas; porém, neste caso, a adequação da metodologia é bastante discutida, como por exemplo: dificuldades como o tempo ideal de cultivo dos isolados e um tempo ideal de incubação com o gás acetileno e, acima de tudo, o fato de o resultado obtido somente representar o momento da detecção e não representar o processo fixador até então ocorrido na planta (RENNIE, 1981; CATTELAN et al., 1999; ESTRADA-DE LOS SANTOS et al., 2001).

O complexo enzimático nitrogenase é extremamente sensível à presença de oxigênio (O_2), podendo ser esta destruída irreversivelmente quando em contato com este elemento. Este fato apresenta um grande problema para a maioria dos microrganismos diazotróficos, com exceção daqueles que possuem um metabolismo anaeróbico. Devido ao fato de a fixação de nitrogênio ser processo estritamente anaeróbico, os diazotróficos aeróbios desenvolveram alguns mecanismos para impedir a interferência do oxigênio no sítio ativo da nitrogenase, como por exemplo: aumento da atividade respiratória, desenvolvimento preferencial em sítios microaerofílicos, produção de polissacarídeos extracelulares e formação de células especializadas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Entretanto, o mecanismo mais evoluído de proteção do sítio ativo da nitrogenase é o que ocorre na simbiose de rizóbios com leguminosas. Dentro dos nódulos existem proteínas com função e composição semelhantes à hemoglobina conhecidas como leg-hemoglobina. Ela é responsável por carregar o oxigênio necessário para a respiração dos bacteroides (nome dado às bactérias intra-nodulares), obtendo assim energia para que ocorra a redução do N-atmosférico a amônio (NH_3). Além disso, esta proteína mantém o oxigênio na forma associada, impedindo que o oxigênio livre afete o funcionamento da nitrogenase. A leg-hemoglobina confere uma cor avermelhada ao interior dos nódulos efetivos (Figura 8.3). Os nódulos que não possuem esta proteína são brancos ou esverdeados no seu interior e não fixam nitrogênio.

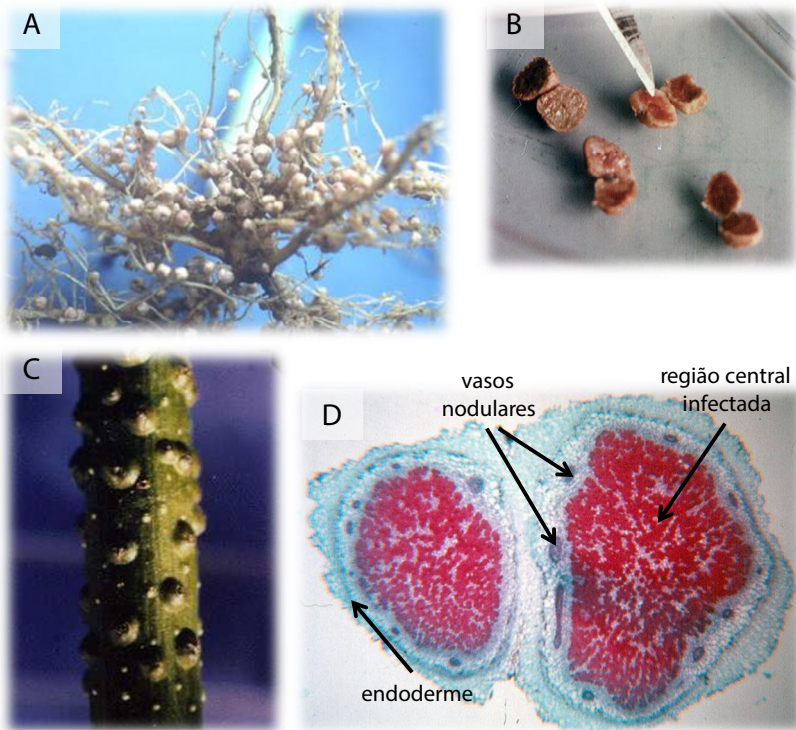


Figura 8.3 - Figuras de nódulos em leguminosas. A) raiz nodulada de soja; B) nódulos ativos, evidenciando a presença de leg-hemoglobina; C) nódulos caulinares em *Aeschynomene afraspera*; D) corte microscópico de nódulo de feijoeiro.

8.5. Fatores que afetam a FBN em leguminosas

A FBN pode ser afetada por diferentes fatores químicos, físicos, bióticos e abióticos, os quais podem influenciar o estabelecimento, desenvolvimento e funcionamento da simbiose. A ineficiência ou ausência da nodulação em determinada espécie pode estar relacionada a estes fatores, podendo reduzir a produtividade dos ecossistemas. Todos estes efeitos podem variar de acordo com a espécie vegetal e com a estirpe envolvida na simbiose. Porém, de maneira geral, alguns dos fatores que afetam a FBN em leguminosas são:

Populações nativas: as populações de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas representam 0,1% da comunidade bacteriana do solo, podendo variar de acordo com as condições edáficas de

cada ambiente (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A capacidade de uma estirpe de rizóbio sobreviver e colonizar um sítio de nodulação em detrimento de outro é definida como competição (LUPWAYI et al., 2005) e, frequentemente, algumas estirpes competem pelo mesmo sítio de infecção na planta hospedeira. Estirpes nativas e ineficientes podem competir com as eficientes provenientes de inoculante. Rizóbios nativos geralmente apresentam maior adaptação ao ambiente, porém, por apresentar elevada competitividade, essas bactérias em geral apresentam ineficiência simbiótica. A presença destas populações pouco contribui para a FBN em leguminosas, tornando necessária a inoculação com estirpes que apresentem eficiência, competitividade e adaptação às condições climáticas e edáficas do local. Para que a população nativa não se torne um fator limitante é também preciso atenção relativa ao número de células viáveis no inoculante, de modo que o número mais elevado confira à população introduzida vantagem competitiva.

Espécie hospedeira: o número total de espécies vegetais pertencentes à família Leguminosae (Fabaceae) é de aproximadamente 16.576. Destas, apenas 23% possuem informações relatadas sobre a capacidade de nodular. Em relação ao potencial de FBN, existe uma ampla variação que pode ser classificada como baixo, médio e alto. Segundo Sanginga (1992), a espécie vegetal *Leucaena leucocephala* pode fixar de 200 a 300 kg de nitrogênio, 10 vezes mais que plantas da espécie *Acacia (Faidherbia) albida*. Assim, a primeira possui alto potencial e a última, baixo potencial. A quantidade de nitrogênio atmosférico convertido a nitrogênio combinado também pode ser afetada pelo genótipo e idade da planta.

Temperatura e Umidade: a temperatura pode afetar etapas importantes da associação entre rizóbios e leguminosas, como a formação do cordão de infecção, colonização da raiz, formação e função dos nódulos. Em temperaturas altas há formação dos nódulos nas plantas, porém, estes são ineficientes em fixar o nitrogênio devido às modificações fisiológicas e bioquímicas nos pares simbiotes. No caso da bactéria, os plasmídeos que são responsáveis por carregar os genes simbióticos podem ser perdidos ou sofrer rearranjos genéticos. Já as temperaturas baixas retardam a infecção e formação dos nódulos. Acredita-se que, de maneira geral, para as leguminosas tropicais, temperaturas diurnas de 25°C a

32°C sejam ótimas para a nodulação. Quando se combina alteração de temperatura com deficiência hídrica, as limitações à FBN em leguminosas podem ser ainda maiores. A redução do potencial hídrico diminui a infecção dos pelos absorventes pelo rizóbio, pode inibir totalmente a produção dos nódulos e afetar a atividade da nitrogenase. Além disso, pode desencadear uma série de respostas fisiológicas e anatômicas nas plantas hospedeiras, como diminuição da emissão de pelos radiculares e descontinuidade da síntese de leg-hemoglobina (GOORMACHTIG et al., 2004).

pH, deficiência de nutrientes e metais pesados: o pH do solo pode ser um fator limitante à FBN, tanto se for abaixo do desejável quanto acima. A acidez está diretamente relacionada a aspectos nutricionais indesejáveis, como: menores teores de fósforo e cálcio e teores excessivos de alumínio. Valores de pH baixo bem como concentrações altas de alumínio em solução (comumente maiores que 10 μ M), possuem um efeito negativo na nodulação. Neste caso, pode-se tornar necessária a calagem com o objetivo de aumentar o pH da solução e diminuir a disponibilidade de alumínio. A toxicidade por alumínio pode reduzir o desenvolvimento radicular das plantas, o que afeta a absorção de nutrientes, diminui a área radicular a ser infectada por bactérias nodulíferas e as torna mais suscetíveis a doenças. A deficiência de fósforo também está associada à mudança de pH no meio. Em solos com valores baixos de pH, por exemplo, este nutriente tende a ficar imobilizado por adsorção dos íons fosfatos nos colóides de óxidos de ferro e alumínio presentes neste tipo de solo. O fósforo é essencial às plantas, e a FBN demanda uma alta quantidade deste nutriente. Assim, sua escassez, de modo generalizado, afeta as simbioses de leguminosas. Micronutrientes como Mo e Co, além do Fe, também são indispensáveis, por fazer parte da enzima nitrogenase (VIEIRA et al., 1998a, 1998b, 1998c.)

N-mineral: a FBN só ocorre em situações de deficiência deste elemento; por outro lado, para que haja infecção, formação e crescimento do nódulo, o rizóbio necessita do N-mineral. Acreditava-se que doses pequenas de nitrogênio podem estimular o crescimento das plantas e aumentar a massa de nódulos produzidos. Entretanto, comumente, a inoculação sozinha resulta em produções equivalentes àquelas obtidas quando se faz adubação com 200 kg N ha⁻¹, pelo menos na soja. O excesso de N mineral nos solos pode diminuir a intensidade da deformação dos pelos absorventes,

adesão do rizóbio e formação do cordão de infecção. Isto se deve ao fato de a nodulação em leguminosas ocorrer em resposta às demandas nutricionais da planta. Altas concentrações de N-mineral reduzem o estímulo de produção de nódulos, porém, o grau de inibição varia de acordo com a forma de nitrogênio aplicada. Recentemente, também foi demonstrado que a co-inoculação com *Azospirillum* e *Bradyrhizobium* melhora o rendimento de grãos de soja, sem adição de fertilizantes nitrogenados (HUNGRIA et al., 2013).

8.6. Benefícios da FBN

A contribuição da FBN proveniente da associação de plantas e bactérias diazotróficas é o processo mais significativo de adição de nitrogênio no ecossistema terrestre e a utilização de microrganismos fixadores na agricultura, especialmente na soja. A inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio em plantas tem potencial de tornar-se uma técnica que pode ser aplicável a sistemas vegetais em condições de déficit hídrico, baixa fertilidade, ou ambas as condições. Isto pode ser possível, pois, além da FBN, existem outros benefícios que podem ser apresentados pelas bactérias diazotróficas. Estes microrganismos podem atuar como rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP), destacando-se a produção de hormônios vegetais, como auxinas, giberelinas e citocininas e também atuar na solubilização de fosfatos (BAZZICALUPO; OKON, 2000).

No Brasil, as bactérias diazotróficas que estabelecem simbiose com leguminosas são as mais utilizadas. Podemos citar como exemplo as lavouras de soja, que geram maior impacto econômico no país. O uso demasiado e incorreto dos fertilizantes é o principal fator de poluição do solo e contaminação de lençóis de água subterrâneos, favorecendo perdas por volatilização e lixiviação, gerando prejuízo aos produtores rurais e ao meio ambiente.

8.7. Produção de Inoculantes

Inoculante é todo material contendo microrganismos e que atua no desenvolvimento das plantas. Os inoculantes contêm bactérias específicas para cada espécie de leguminosa. Por este motivo, o inoculante preparado para uma determinada planta geralmente não pode ser utilizado em outras espécies vegetais. Os benefícios econômicos, sociais e ambientais que o

uso de inoculantes pode trazer são inúmeros, sendo que alguns deles são: grande economia de fertilizante nitrogenado mineral, maior produtividade das culturas, preservação da microbiota e da microfauna do solo, não provoca danos ao meio ambiente e reduz o custo de produção.

O uso de inoculante com bactérias fixadoras de nitrogênio pode substituir total ou parcialmente a necessidade de adubação nitrogenada. O melhor exemplo do sucesso desta tecnologia é o caso da cultura da soja. No caso dessa cultura, bactérias pertencentes às espécies *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* são as responsáveis por esse processo, sendo que estas podem substituir o uso de adubos, o que equivale a uma economia entre 10 e 15 bilhões de dólares anuais para o Brasil, dependendo de como este valor é calculado (HUNGRIA et al., 2015).

Existe necessidade de inoculação em locais onde é observada a ausência de espécies hospedeiras ou de outra espécie simbioticamente relacionada, quando a nodulação é pobre em espécies já cultivadas e quando a leguminosa sucede a uma cultura não leguminosa em rotação. Também é recomendado o uso de inoculante em locais onde está sendo realizada recuperação de solos degradados porque normalmente estes solos não possuem número de células de rizóbios superior a 50 células por grama de solo, e quando as condições ambientais são desfavoráveis para sobrevivência do rizóbio, como em solos alcalinos ou ácidos, ou também em condições de inundação prolongada, temperaturas elevadas ou secas (ROUGHLEY, 1988; PEOPLES et al., 1989; de TURK et al., 1993).

As recomendações da RELARE (Rede de Laboratórios para a Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola) para que um inoculante possa ser comercializado são: o produto deve apresentar 1×10^9 células viáveis por grama ou mililitro do produto até a data do seu vencimento; deve ser elaborado em um suporte ou veículo estéril e estar livre de microrganismos não especificados em fator de diluição 1×10^{-5} , sendo que o veículo deve fornecer todas as condições de sobrevivência ao microrganismo.

Além das condições do local e os pré-requisitos do produto, as bactérias que serão utilizadas também são alvo de estudos. Para que uma bactéria seja selecionada e multiplicada para produção de um inoculante, ela deve seguir alguns critérios como habilidade de formar nódulos e fixar N na espécie alvo ou habilidade de fixar N em uma ampla faixa de hospedeiros; ser capaz de crescer em meio artificial, no veículo do inoculante e no solo; ter uma boa estabilidade genética; possuir a

capacidade de sobreviver na superfície da semente; ter compatibilidade com agroquímicos; habilidade de competir com a população nativa de rizóbios já presente no solo; capacidade de suportar condições ambientais adversas; habilidade de formar nódulos na presença de N combinado no solo; habilidade de persistir no solo, principalmente no caso de leguminosas que se regeneram anualmente, e habilidade de colonizar o solo na ausência da planta hospedeira (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Como já citado, a técnica de aplicação de inoculantes e o sucesso da tecnologia depende de inúmeros fatores. Utilizar as vantagens que essa tecnologia pode trazer a nosso favor não é tarefa fácil, porém inúmeros esforços estão sendo realizados para que a FBN possa contribuir ainda mais para o aumento da produção e melhoria da qualidade de vida.

8.8. Interação da inoculação de leguminosas com outros fatores de manejo

Esta tecnologia tem grande potencial de utilização, sendo observada a junção de conceitos importantes como a utilização de interações entre microrganismos e plantas, que são otimizadas na presença de composto orgânico, bio sólido, lodo de curtume ou outros materiais orgânicos. No entanto, a dosagem utilizada está relacionada com o tipo de solo em que a recuperação será feita (Figura 8.4). Pode-se verificar que a nodulação de plantas de soja aumenta de forma proporcional à dosagem de lodo utilizado até o momento em que este material passa a ter efeito tóxico. Este ponto de toxicidade é diferente em solos com diferentes texturas (Figura 8.4), sendo que o desenvolvimento diferencial das plantas leva a distinções claras em sua produtividade. Dessa forma, este fator é muito importante de ser considerado ao se utilizar materiais orgânicos na recuperação de áreas degradadas.

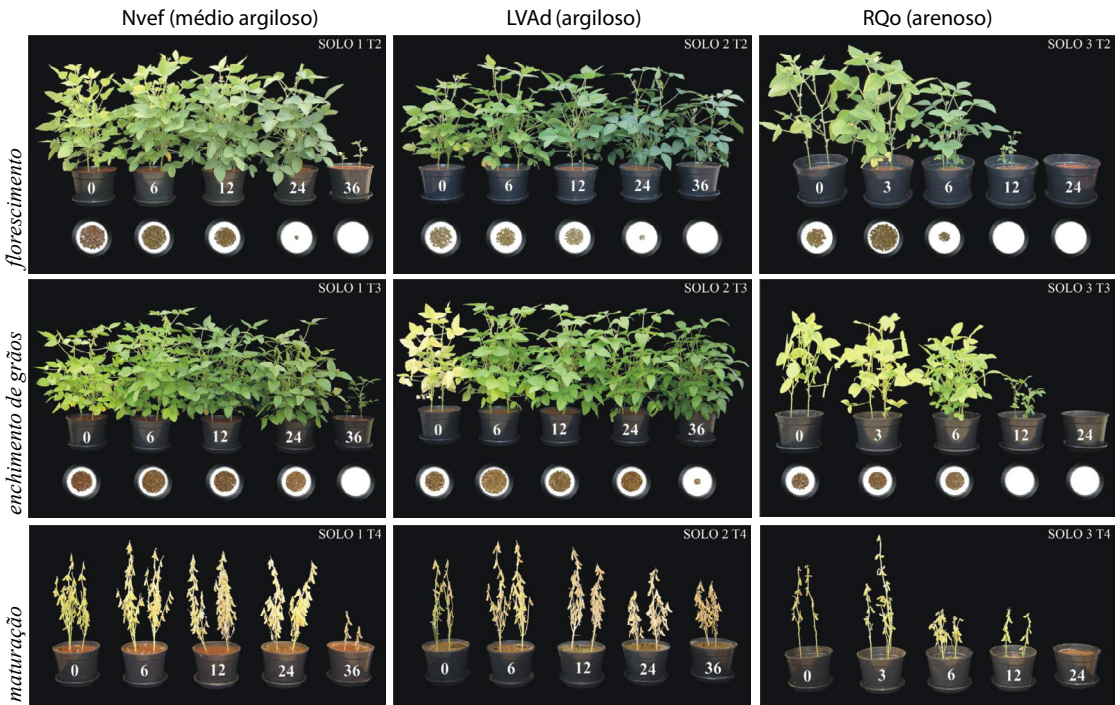


Figura 8.4 - Solos argilosos receberam doses de 0 a 36 Mg de lodo por ha e o solo arenoso de 0 a 24 Mg. Ver deficiência de N em solos sem adição de lodo (N). Abaixo de cada vaso uma caixa de Petri com os nódulos produzidos. Fotos após estabelecimento das plantas, em meio do ciclo e em produção final. Fotos: Martines, A. et al., 2006.

8.9. As actinorrizas

Actinorriza é o nome que se dá aos nódulos formados em outro tipo de fixação simbiótica do nitrogênio. Estes nódulos são formados em raízes de algumas plantas de diversas famílias vegetais, sendo os principais gêneros conhecidos por esta propriedade a *Casuarina*, a *Myrica*, o *Alnus*. Podem também formar actinorrizas alguns representantes das ordens Fagales, Rosales e Cucurbitales (WALL, 2000; RUSSO, 2005). A bactéria responsável pela FBN é do gênero *Frankia*, classificado entre as Actinobactérias. A estrutura do nódulo também é um pouco diferente daquela dos nódulos

de rizóbios. As quantidades de nitrogênio fixadas variam de 10 a mais de 200 kg de N ha⁻¹ano⁻¹. As árvores que fazem parte desse grupo são empregadas principalmente para a revegetação de solos degradados ou como quebra-ventos. Esta última função é também comumente explorada no Brasil, principalmente com a Casuarina.

Entretanto, essas plantas fazem geralmente parte de estratos florestais em clima temperado, onde podem ser responsáveis por mais de 50% do nitrogênio fixado por essas plantas.



Figura 8.5 - Estrutura radicular indicando a presença de actinorrizas, nódulos de raízes formados pela actinobactéria *Frankia* sp. em várias famílias arbóreas.

8.10. Considerações Finais

A FBN associada a leguminosas (com destaque para a soja) é o maior exemplo de sucesso da exploração de um processo oriundo de componentes da biologia do solo em um cenário econômico. A aplicação do conhecimento gerado sobre este processo leva a ganhos econômicos e ambientais inestimáveis a cada ciclo de cultivo destas plantas.

No entanto, uma maior aplicação deste conhecimento em outras leguminosas ainda é dependente de um maior número de estudos sobre suas particularidades, além da inserção desta característica em programas de melhoramento vegetal das mais diferentes espécies de leguminosas.

Não se pode negar a crescente aplicabilidade da inoculação de sementes com este propósito, bem como o desenvolvimento de diversas linhas de pesquisa associadas a esta tecnologia, como a diversificação nos métodos de inoculação das sementes, o desenvolvimento de metodologias que dão maior longevidade do inóculo em sementes inoculadas, bem como o manejo empregado no sistema produtivo, que sempre considera a viabilidade do inoculante como fator importante a ser preservado nos campos de produção. Dão ainda suporte a um cenário promissor, a exploração de uma ampla biodiversidade de bactérias capazes e desempenhar a função de fixadoras do N em associação com diversas plantas, sendo a origem destes novos inoculantes os diferentes biomas encontrados em nosso país.

Espera-se que os ganhos obtidos com esta tecnologia sustentem e instiguem a exploração dos incontáveis outros processos que residem na biologia do solo, que estão prontamente aptos a serem explorados biotecnologicamente.

8.11. Estudo de Caso

Um produtor de soja (safra) e milho (safrinha) verificou que após 10 anos de constante aplicação de inoculantes em suas sementes, poderia ser descartado este procedimento em algumas de suas áreas. No entanto, um vizinho desta propriedade, buscando economizar em seus gastos com inoculantes, gostaria de saber como ele selecionou as áreas em que deixou de inocular as sementes. Em sua opinião, quais características devem estar presentes nas áreas onde a inoculação não se mostrou mais necessária? De maneira geral, a remoção deste processo é viável econômica e ambientalmente?

Referências

BAREA, J.M.; AZCÓN, R.; AZCÓN-AGUILAR, C. Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in nitrogen-fixing systems. **Methods in Microbiology**, London, v. 24, p. 391-416, 1992.

BAZZICALUPO, M.; OKON, Y. Associative and endophytic symbiosis. In: PEDROSA, F. et al. (Ed.). **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000.

CARDOSO, E.J.B.N. Eficiência de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares em soja, com *Rhizobium japonicum* e fosfato de rocha, em função do tipo de solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 10, p. 17-23, 1986.

CARDOSO, E.J.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. 360 p.

CATTELAN, A.J.; HARTEL, P.G.; FUHRMANN, J.J. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 63, p.1670-1680, 1999.

CHEN, W.M. et al. *Burkholderia mimosarum* sp. nov. isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 56, n. 8, p. 1847-1851, 2006.

CORBY, H.D.L. The systematic value of leguminous root nodules. In: INTERNATIONAL LEGUME CONFERENCE, 1981, London. **Advances in legume systematics: proceedings...** London: Royal Botanical Gardens, 1981. pt. 2, p. 657-670.

DE TURK, E.E.; HOLBERT, J.R.; HAWK, B.W. Chemical transformation of phosphorus in the growing corn plant with results on two first generation crosses. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 46, p. 121, 1933.

DEBELLÉ, F. et al. Nod genes and Nod signals and the evolution of the rhizobium legume symbiosis. **Acta Biochimica Polonica**, Varsovia, v. 48, n. 2 p. 359-365, 2001.

DÖBEREINER, J.; ALVAHYDO, R. Influência da umidade de solos na população do gênero *Beijerinckia* derx. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 11, n. 4, p. 208-218, 1959.

EHRHARDT, D.W.; ATKINSON, E.M.; LONG, S.R. Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium melliloti* Nod factors. **Science**, Washington, v. 256, p. 998–1000, 1992

ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. Burkholderia, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 2790–2798, 2001.

FRANCO, A.A. et al. Uso de leguminosas florestais noduladas e micorrizadas como agentes de recuperação e manutenção da vida no solo: um modelo tecnológico. In: ESTEVES, F. (Ed.). **Oecologia brasilienses**. Rio de Janeiro: UFRJ, 1995.

GLOUDEMANS, T.; BISSELING, T. Plant gene expression in early stages of the *Rhizobium*-legume symbiosis. **Plant Science**, Calcutta, v. 65, p. 1-14, 1989.

GOORMACHTIG, S.; CAPOEN, W.; HOLSTERS, M. Rhizobium infection: lessons from the versatile nodulation behaviour of water-tolerant legumes. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 9, p. 518–522, 2004.

GOVERS, F. et al. *Rhizobium* nod genes are involved in inducing and early nodulin gene. **Nature**, London, v. 323, p. 564-566, 1986.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, p. 151-164, 2000.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M.A.; ARAUJO, R.S. Alternative methods of soybean inoculation to overcome adverse conditions at sowing. **African Journal of Agricultural Research**, Pretoria, v. 10, n. 23, p. 2329-2338, 2015.

HUNGRIA, M. et al. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 49, p. 791-801, 2013.

JESUS, E.C. et al. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 8, p. 769-776, 2005.

KAHINDI, J.H.P. et al. Agricultural intensification, soil biodiversity and ecosystem function in the tropics: the role of nitrogen-fixing bacteria. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 6, p. 55-76, 1997.

KIM, J.; REES, D.C. Crystallographic structure and functional implications of the nitrogenase molybdenum-iron protein from *Azotobacter vinelandii*. **Nature**, London, v. 360, p. 553-560, 1992.

LAMMEL, D.R. et al. Rhizobia and other legume nodule bacteria richness in Brazilian *Araucaria angustifolia* forest. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, p. 400-408, 2007.

_____. Woody Mimosa species are nodulated by Burkholderia in ombrophylous forest soils and their symbioses are enhanced by arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). **Plant and Soil**, Hague, v. 393, n. 1-2, p. 123-135, 2015.

LUPWAYI, N.Z.; CLAYTON, G.W.; RICE, W.A. Rhizobial inoculants for legume crops. **Journal of Crop Improvement**., New York, v. 15, p. 289-321, 2005

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2.ed. Lavras: Ed. UFLA, 2006. 729 p.

PEOPLES, M.B. et al. (Ed.). **Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field**. Camberra: Australian Centre for International Agricultural Research, 1989. 76 p.

REIS, V.M.; TEIXEIRA, K.R.S. Fixação biológica de nitrogênio-estado da arte. In: AQUINO, A.M.; ASSIS, R.L. **Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2005. p.151-180.

RENNIE, R.J. A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 27, n. 1, p. 8-14, 1981.

ROUGHLEY, R.J. Legume inoculants: their technology and application. In: BECK, D.P.; MATERON, L.A. (Ed.). **Nitrogen fixation by legumes in Mediterranean agriculture**. Dordrecht: Elsevier, 1988. v. 2, p. 259-268.

RUSSO, R.O. Nitrogen-fixing trees with actinorhiza in forestry and agroforestry. In: WERNER, D.; NEWTON, W.E. **Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment**. New York: Springer, 2005. p. 143-171.

SANGINGA, N. Early growth and N₂-fixation of leucaena and gliricidia at different levels of phosphorus application. **Fertilizer Research**, Amsterdam, v. 31, p. 165-173, 1992.

SMIL, V. Detonator of the population explosion. **Nature**, London, v. 400, p. 415, 1999.

SOUZA, L.A.G.; AGUIAR, A.M.C.S.P. **Contribuição para a chek-list das Fabaceae de Pernambuco**. Natal: Opção Gráfica, 2009. 172 p.

STOUGAARD, J. Regulators and regulation of legume root nodule development. **Plant Physiology**, Stuttgart, v. 124, p. 531–540, 2000.

VIEIRA, R.F. et al. Foliar application of molybdenum in common beans. I. Nitrogenase and reductase activities in a soil of high fertility. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 21, n. 1, p. 168-180, 1998a.

_____. Foliar application of molybdenum in common beans. II. Nitrogenase and reductase activities in a soil of low fertility. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 21, n. 10, p. 2141-2151, 1998b.

_____. Foliar application of molybdenum in common beans. III. Effect on nodulation. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 21, n.10, p. 2153-2161, 1998c.

WALL, L.G. The actinorhizal symbiosis. **Journal of Plant Growth Regulation**, Amsterdam, v. 19, p. 167–182, 2000.

WILLIAMS, L.E.; MILLER, A.J. Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. **Annual Review Plant Physiology and Molecular Biology**. New York, v. 52, p. 659-688, 2001.

YOUNG, J.P.W. Phylogeny and taxonomy of rhizobia. **Plant and Soil**, Hague, v.186, p.45-52, 1996.

ZGADZAJ, R. et al. Legume genetic framework controls infection of nodules by symbiotic and endophytic bacteria. **Plos Genetics**, São Francisco, v. 11, n. 6, p. 1-21, 2015.

CAPÍTULO 9

FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO ASSOCIATIVA E DE VIDA LIVRE

Alice de Sousa Cassetari, Sandra Patrícia Montenegro Gomez, Mylenne C. P. Silva

9.1. Introdução

A FBN é responsável pela fixação de grandes quantidades de nitrogênio, dando a este processo relevante importância na manutenção da vida na terra, sendo entre os processos biológicos que ocorrem no planeta, o segundo mais abundante, juntamente com a decomposição da matéria orgânica, perdendo apenas para a fotossíntese.

A FBN em leguminosas sempre despertou grande interesse dos pesquisadores devido sua grande eficiência e importância para a agricultura, como visto no capítulo anterior. Porém, com o passar dos anos, outras comunidades microbianas do solo foram ganhando destaque no meio científico. A maioria das espécies de bactérias diazotróficas é de vida livre e estas ocorrem em todos os tipos de solo, na rizosfera e filosfera das plantas, em águas doces e salgadas e no trato intestinal de animais. Alguns diazotróficos também podem ser encontrados em simbiose com fungos, diatomáceas e/ou com várias espécies vegetais, enquanto estabelecem relações menos especializadas com plantas, denominadas associações (MOREIRA; SEQUEIRA, 2006). Nos mais variados habitats, livres ou associadas, todas as bactérias diazotróficas utilizam um sistema fundamental de fixação de nitrogênio, baseado na redução do nitrogênio atmosférico à amônia pela ação da enzima nitrogenase.

Os estudos sobre a FBN associativa se intensificaram a partir da década de 50, quando o grupo coordenado pela pesquisadora Johanna Döbereiner descobriu a associação de alta especificidade entre a bactéria

Azotobacter paspali e a gramínea *Paspalum notatum* cv *batatais*. Desde então, grandes esforços têm sido realizados para entender as associações entre as bactérias e as gramíneas e os estudos com bactérias de vida livre e associativas com elevado potencial biotecnológico (*Azotobacter chroococcum*, *Beijerinckia fluminensis*, *Azotobacter paspali*, *Dexia* spp., *Paenebacillus azotofixans*), bactérias diazotróficas associativas (*Azospirillum* spp. e *Burkholderia* spp.) ou bactérias diazotróficas endofíticas (*Herbaspirillum* spp. e *Burkholderia* spp.) foram intensificados (MOREIRA et al., 2010).

Estas bactérias colonizam as plantas com as quais se associam de forma distinta da observada para a interação de rizóbios com leguminosas. Neste caso, elas colonizam a rizosfera ou mesmo a superfície e o interior das raízes, caules e folhas. A rizosfera é a fração do solo que sofre influência da liberação de exsudatos de raiz, onde as bactérias presentes no solo e que têm a capacidade de responder a estes exsudatos, aumentam suas respectivas populações e passam a interagir de maneira mais intensa com a espécie vegetal em desenvolvimento. Já as bactérias que colonizam o tecido interno das plantas são chamadas de endofíticas (ANDREOTE et al., 2014). Nas gramíneas, a presença de rizobactérias promotoras de crescimento e bactérias endofíticas é muito evidente (BALDANI et al., 1996).

Como as bactérias diazotróficas associativas e de vida livre estão presentes em muitos ambientes, sua presença pode levar a uma ampla adaptação a diversos ecossistemas, tendo, assim, grande influência na sustentabilidade ambiental e agrícola (REED et al., 2011). Deste modo, o aproveitamento máximo da contribuição do nitrogênio fornecido por esses microrganismos pode representar um importante ganho tanto ecológico como econômico.

9.2. Importância da FBN associativa e de vida livre

Grande número de plantas não leguminosas tem a capacidade de formar associações exógena ou endógena com bactérias diazotróficas. Esta característica pode ser uma potencial fonte de N para a agricultura e tem grande importância econômica e ecológica.

Ambientalmente, o papel dos organismos fixadores de N₂ de vida livre está relacionado à entrada de nitrogênio no sistema. Como descrito anteriormente (Capítulo 7), o nitrogênio atmosférico é o maior reservatório

de nitrogênio na biosfera, porém sua entrada nos diferentes sistemas terrestres e aquáticos é exclusivamente promovida pela fixação biológica do nitrogênio, com destaque para aquela realizada por organismos de vida livre.

Já na área agrícola, algumas culturas de importância comercial, como arroz, trigo, milho, sorgo e cana-de-açúcar, têm sido reportadas na literatura como capazes de formar associações com diversas bactérias diazotróficas. Considerando a grande extensão de terras recobertas por estas culturas, sua importância ganha grandes proporções. Tem-se verificado que áreas de pastagem com gramíneas e cana-de-açúcar têm mantido níveis razoáveis de produtividade sem grande aplicação de fertilizantes nitrogenados, o que indica que este fenômeno poderia estar relacionado com a contribuição da FBN por microrganismos diazotróficos associativos (MOREIRA et al., 2010). Os primeiros diazotróficos de vida livre identificados, *Beijerinckia fluminensis*, *Beijerinckia indica* e *Azotobacter* foram isolados da superfície das raízes da cana-de-açúcar. As bactérias do gênero *Beijerinckia* foram localizadas em 95% de solos cultivados com cana-de-açúcar (DÖBEREINER, 1959). Outro grupo de microrganismos diazotróficos associativos que se destacam são os *Azospirillum* spp., devido a sua ampla distribuição geográfica, além da capacidade de colonizar plantas em diversos habitats (BALDANI et al., 1997).

Trabalhos apontam ganhos significativos de produção com o uso de bactérias fixadoras de N em gramíneas. A contribuição de FBN associada às plantas de cana-de-açúcar cultivada no campo pode variar de zero a 70% (POLIDORO et al., 2002). Em alguns genótipos de gramíneas também foram relatados, através de técnicas isotópicas, ganhos de aproximadamente 30% associados à FBN (REIS et al., 2001). Estes valores são baixos quando comparados ao aporte de nitrogênio oferecido por bactérias fixadoras que interagem com leguminosas. Essa diferença se dá principalmente pela modulação das bactérias fixadoras de vida livre pelas condições ambientais, que são altamente variáveis, enquanto que as fixadoras simbióticas trabalham sob condições ambientais mais constantes, armazenadas dentro dos nódulos.

No entanto, estes valores, ainda que menores, representam grandes ganhos econômicos e ambientais. Enquanto a adubação nitrogenada gera perdas de N por volatilização, lixiviação e desnitrificação em torno de 50%, pouca ou nenhuma perda de N pode ser verificada por meio da FBN associativa, já que o nitrogênio fixado por essa via está disponível

diretamente para as plantas. Ao mesmo tempo, essa fixação melhora e conserva os recursos naturais, além de diminuir a carga econômica da compra de fertilizantes nitrogenados para a produção agrícola.

9.3 Microrganismos diazotróficos de vida livre

Graças à sua vantagem na captação de N, os diazotróficos de vida livre são pioneiros na colonização de nichos pobres neste nutriente dentro dos mais diferentes ecossistemas (KENNEDY; TCHAN, 1992). As bactérias de vida livre foram as primeiras diazotróficas a serem reconhecidas por Sergei Winogradsky. Ele conseguiu isolar pela primeira vez a bactéria que chamou de *Clostridium pastorianum* (mais tarde renomeada como *C. pasteurianum*). Estudos envolvendo apenas a entrada de N via FBN por microrganismos de vida livre em florestas tropicais de Porto Rico estimaram que a taxa anual de N fixado era em torno de 3 a 12 kg de N/ha em floresta com altitude mais baixa, e entre 1 e 8 kg de N/ha em floresta com altitude elevada (CUSACK et al., 2009).

As bactérias aeróbias são as mais comumente encontradas como fixadoras de N₂ nos solos, sendo mais reconhecidas as bactérias da família *Azotobacteriaceae*. As bactérias microaerofílicas, comuns na rizosfera de cana de açúcar, compreendem os gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum*. No que se refere às taxas de FBN, estas podem variar significativamente dentro de um mesmo ambiente. A FBN pode ser mais ativa em áreas do ecossistema em que a demanda e as perdas de N são relativamente mais altas. Um exemplo descrito por Hedin et al (2009) apresenta-se na serapilheira em avançado estado de decomposição, onde as altas relações C/N aumentam a demanda de N-combinado, estimulando a atividade de fixadores. Reed et al. (2007) observaram, numa floresta tropical, durante o processo da decomposição da serapilheira, a existência de um aumento da FBN de vida livre. Assim, o aporte de N por FBN de vida livre pode ser crítico em determinadas situações como, por exemplo, na decomposição foliar, ou reposição de perdas de N (HEDIN et al., 2009).

Outras bactérias diazotróficas de interesse agrícola são as cianobactérias que, apesar de sobreviverem em vida livre, também estabelecem associações com diversos membros do reino vegetal e podem contribuir em grandes proporções com o nitrogênio fixado (PRASANNA et al., 2012). Tem destaque neste ponto a colonização de cianobactérias em ambientes pobres em nitrogênio, ou associadas à filosfera das plantas em ambientes naturais.

9.4 Microrganismos associativos

Este grupo de microrganismos fixadores de N_2 é caracterizado pela ocupação de nichos diretamente relacionados com a existência de plantas. Dessa forma, mesmo esta interação entre planta e microrganismos não sendo essencial ao processo de fixação do nitrogênio, a planta recebe parte deste nutriente transformado pela atividade microbiana. Dentre as comunidades bacterianas que podem atuar neste processo e estão em associação com as plantas, destacam-se as comunidades bacterianas da rizosfera e as endofíticas (ANDREOTE et al., 2014). Porém, deve-se destacar que muitas das bactérias associativas passam parte de suas vidas como endófitas e parte sobrevivendo na rizosfera (JAMES et al., 2007).

A característica de obter nitrogênio da atmosfera de forma independente de interações biológicas dá uma grande vantagem ao estudo deste grupo de microrganismos. O isolamento de bactérias diazotróficas associativas ocorre de forma diferente do que é realizado para bactérias diazotróficas simbióticas. Neste caso, o isolamento é feito com o uso de meios seletivos que permitam o isolamento de diazotróficos a partir de comunidades com alta diversidade de espécies como as que ocorrem no ambiente edáfico. A principal característica seletiva destes meios é a ausência de N na forma combinada, o que inibe a multiplicação de outras bactérias, permitindo apenas a multiplicação de grupos bacterianos capazes de utilizar o N_2 , mesmo na ausência da planta hospedeira.

9.4.1. Microrganismos endofíticos

Os endófitos são, de maneira geral, caracterizados como os microrganismos que vivem em tecidos internos da planta, sem causar mal ao hospedeiro. Segundo Azevedo et al. (2000), microrganismos endofíticos são os que colonizam os tecidos internos da planta sem causar danos aparentes ao hospedeiro e sem produzir estruturas externas visíveis, diferenciando-se das bactérias formadoras de nódulos e de fungos micorrízicos (que não deixam de ser endófitos). Segundo classificação de Baldani et al. (1997) e Hardoim et al. (2008), os microrganismos associativos podem ser classificados em dois grupos: os endofíticos facultativos, que sobrevivem tanto na rizosfera quanto no interior das raízes e os endofíticos obrigatórios, que sobrevivem apenas no interior das raízes. Entretanto, existem várias bactérias diazotróficas que passam algum tempo como saprófitas no solo, alternando com os períodos de vida endofítica.

Muitos estudos buscam descrever o papel das bactérias endofíticas no desenvolvimento vegetal. Dentre estas, as mais numerosas relacionam a ocorrência destes grupos nas plantas com a capacidade que as mesmas têm de suprir o hospedeiro com formas assimiláveis de nitrogênio.

A fixação biológica de nitrogênio foi descrita inicialmente em bactérias de vida livre, porém, em bactérias associativas, esta é mais amplamente distribuída em gramíneas. Em cana-de-açúcar, este processo é de extrema importância, sendo desempenhado primordialmente por bactérias diazotróficas endofíticas. Um exemplo são as bactérias do gênero *Azospirillum* (BALDANI et al., 1996) que, através da FBN, podem proporcionar ganhos de até 30% de produtividade nesta cultura. Outro grupo de grande importância nesta cultura é representado pelo gênero *Herbaspirillum*, considerado uma bactéria endofítica obrigatória, com baixa sobrevivência no solo (JAMES et al., 2007). Sua principal característica é colonizar o interior dos tecidos vegetais, podendo transferir mais eficientemente para a planta os compostos nitrogenados produzidos. Em contrapartida, estas não sofrem limitações de substâncias ricas em carbono, que são transferidas da planta hospedeira para a bactéria. No entanto, para cana-de-açúcar, a espécie protagonista da fixação biológica do N_2 é a *Gluconoacetobacter diazotrophicus*, eficiente na colonização interna da planta, ocupando os espaços intercelulares, ricos em sacarose e com pH baixo, sugerindo que a localização da bactéria na planta está relacionada ao seu requerimento nutricional e tolerância às condições desfavoráveis à sobrevivência para a maioria das outras bactérias endofíticas (OLIVARES et al., 1997).

De acordo com Sala et al. (2007) foi demonstrado que algumas bactérias também são capazes de colonizar o interior das raízes de outras culturas como, por exemplo, *Burkholderia vietnamiensis* encontrada em plantas de milho e de cana-de-açúcar, *Serratia marcescens*, isolada de raízes de plantas de arroz, e *Achromobacter insolitus* e *Zoogloea ramigera*, em plantas de trigo (SALA et al., 2008). A inoculação de arroz e trigo com bactérias endofíticas tem mostrado resultados em ganhos significativos de produção e economia no uso de fertilizantes, chegando a acumular 20 a 30% do nitrogênio existente na parte aérea por esse processo (CANUTO et al., 2003).

De forma geral, pode-se considerar que a grande maioria das plantas (senão sua totalidade) depende em parte do fornecimento de nitrogênio promovido por microrganismos que colonizam seus tecidos internos. O crescente número de estudos que descrevem este processo

nas plantas faz com que seja possível sugerir que não há plantas que desprezam este valioso serviço da microbiota associada.

9.4.2. Microrganismos rizosféricos

A rizosfera é a fração do solo que sofre influência da liberação de exsudatos de raiz (ver capítulo 4). A comunidade microbiana que sobrevive nesse ambiente e sofre influência dos exsudatos da raiz são os microrganismos rizosférico. A interação entre planta e microrganismos da rizosfera pode sofrer muitas alterações com o ambiente, sendo uma comunidade muito sensível a variações ambientais (ANDREOTE et al., 2014). As bactérias que são capazes de colonizar e persistir na região rizosférica das plantas são denominadas rizobactérias (WELLER; THOMASHOW, 1994).

Algumas rizobactérias são importantes bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico com destaque para as afiliadas aos gêneros *Azotobacter*, *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* e *Bacillus* (KLOEPPER et al., 1989). A importância da fixação biológica do N_2 na rizosfera é grande, sendo esta característica relacionada a diversos processos de sobrevivência neste ambiente. Primeiramente, a capacidade de um organismo obter sua nutrição nitrogenada de uma fonte inexplorada pela maioria de seus competidores é uma vantagem no ambiente rizosférico. Adicionalmente, considerando que a planta exsuda uma série de compostos carbônicos, com estruturas específicas e direcionadas a organismos específicos (como discutido no capítulo 4), é mandatório que o organismo receptor seja apto a complementar a nutrição fornecida pela planta, rica em C, para que este possa ter seu metabolismo eficientemente ativado pelos compostos liberados na exsudação radicular. Assim sendo, dentre as características desejáveis a estes organismos está a fixação do N_2 .

A utilização prática deste recurso deve aprimorar o estímulo da ocupação do ambiente rizosférico por bactérias promotoras da FBN. Alguns estudos mostram este efeito, com destaque neste ponto para as bactérias dos gêneros *Enterobacter* e *Azospirillum*, eficientes colonizadores da rizosfera de milho. Nesta cultura foi estabelecido, pela técnica da diluição do N isótopo (^{15}N), que existe uma contribuição significativa de FBN realizada por bactérias da rizosfera (GARCIA DE SALAMONE et al., 1996).

9.4.3. As cianobactérias

As cianobactérias pertencem a um dos mais importantes, maiores e mais diversificados grupos de bactérias existentes no planeta. A capacidade de realizar fotossíntese similar à de plantas é uma característica universal das cianobactérias que as distingue de todas as outras bactérias. Acredita-se que esses microrganismos foram os primeiros organismos a liberar oxigênio elementar na atmosfera primitiva (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

As cianobactérias são os únicos microrganismos capazes de realizar esse tipo de fotossíntese e a fixação biológica de nitrogênio. Todas as cianobactérias são capazes de realizar fotossíntese, porém o processo de fixação de nitrogênio atmosférico não está presente em todos os grupos de cianobactérias descritos. Nos grupos de cianobactérias fixadores de N_2 , este processo é separado da fotossíntese temporalmente ou espacialmente. A separação espacial é dirigida principalmente pela incidência de luz sobre a célula das cianobactérias, processo este que dispara a ocorrência do processo fotossintético e inibe a fixação biológica no N_2 (uma vez que a nitrogenase é sensível à presença de O_2 , produto final da fotossíntese). Complementarmente, na ausência de luz, a quantidade de O_2 no interior das células é diminuído, dando origem ao ambiente propício para a fixação biológica do N_2 . Já a separação espacial é feita por espécies de cianobactérias capazes de formar células diferenciadas, denominadas heterocistos. O heterocisto possui parede celular mais espessa e um bloqueio no fotossistema II, o que limita a ocorrência de O_2 no interior destas células. Dessa forma, além de proporcionar condições para o bom funcionamento da enzima nitrogenase, também tem a função de abastecer todo o resto do filamento com os compostos nitrogenados formados pela fixação do nitrogênio (ADAMS; DUGGAN, 1999) (Figura 9.1).

A expressão dos genes do desenvolvimento dos heterocistos e FBN se dão somente quando a fonte de nitrogênio no ambiente passa a ser limitada. Assim, espécies fixadoras de nitrogênio são encontradas preferencialmente em locais com baixa quantidade de N no solo (STARKS et al., 1981). Espécies do gênero *Nostoc* estão entre as cianobactérias mais reconhecidas pela sua capacidade de fixação biológica de nitrogênio nos mais diversos ambientes (DODDS et al., 1995).

A fixação biológica promovida pelas cianobactérias parece ter grande importância em ambientes naturais, onde a longevidade das folhas dá base ao desenvolvimento de comunidades microbianas mais estruturadas na filosfera, dando às cianobactérias local de destaque na

obtenção de nitrogênio neste ambiente oligotrófico. Assim, pode-se atribuir grande parte do aporte de nitrogênio em ambientes naturais à atividade de cianobactérias colonizadoras da filosfera. No campo agrícola, sabe-se da importância das cianobactérias na cultura de arroz (KNAUTH, 2005), onde existe a descrição da efetiva associação entre cianobactérias do gênero *Anabaena* com a planta aquática *Azolla*. Esta planta tenra, com tecidos que apresentam baixíssima relação C/N, obtém a maior parte do nitrogênio para sua nutrição a partir da colonização de suas folhas reticuladas por cianobactérias do gênero *Anabaena*. Esta associação foi então explorada comercialmente em áreas de cultivo de arroz irrigado, onde o cultivo prévio desta planta aquática mostrou-se eficiente em aumentar o nitrogênio dissolvido no solo após a incorporação da biomassa de *Azolla* cultivada previamente ao ciclo de cultivo de arroz.

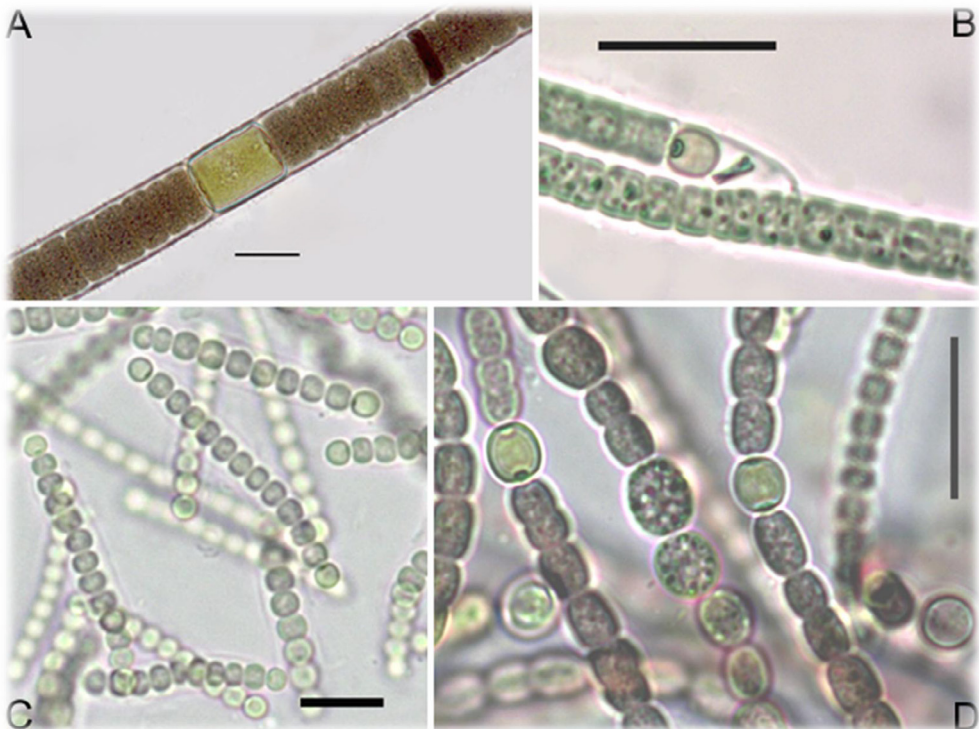


Figura 9.1 - Tricomas de cianobactérias contendo heterócitos (ordem Nostocales). (A) *Brasilonema octagenarum*; (B) *Tolypothrix* sp.; (C e D) *Nostoc* spp. Barras: 10 μ m. (Fotos: Ana Paula Dini Andreote e Marli de Fátima Fiore)

Tanto bactérias diazotróficas associativas quanto de vida livre têm a capacidade de estimular o crescimento das plantas por mecanismos diretos, como também por meio da fixação biológica de nitrogênio ou produção de fitormônios, ou de maneira indireta, atuando contra patógenos. Por esse motivo, as bactérias diazotróficas associativas são também consideradas rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP) e assumem papel importante na interação com raízes de plantas e ciclagem de nutrientes (MOREIRA et al., 2010). As rizobactérias foram alvo de atenção em processos de biorremediação, pois, embora não possam atuar sobre os compostos inorgânicos, podem degradar e mesmo mineralizar compostos orgânicos em associação com plantas (ZHUANG et al., 2007).

Algumas espécies dos gêneros *Pseudomonas*, *Azotobacter* e *Bacillus* são capazes de liberar fitormônios como o ácido indolacético (AIA), giberelinas ou citocininas na rizosfera de plantas, exercendo um efeito estimulador do crescimento da planta, especialmente nas fases iniciais da germinação de sementes. É possível também que essas bactérias possam suprimir doenças causadas por microrganismos fitopatogênicos através da produção de sideróforos, síntese de antibióticos e enzimas (LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009).

Vários estudos têm mostrado a habilidade de diferentes espécies bacterianas em solubilizar compostos de fosfato inorgânico, convertendo o fosfato insolúvel em formas solúveis nos solos, e tornando-o disponível para as plantas, como ocorre com bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium* e outros (ESTRADA, 2015).

Importante ressaltar ainda que algumas bactérias promotoras de crescimento vegetal produzem a enzima 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico desaminase (ACC desaminase). Essa enzima pode ser parte de um mecanismo que estimula o crescimento vegetal e garante que níveis de etileno sejam menores em plantas em desenvolvimento ou estressadas. A produção de etileno na planta é consequência de uma resposta das plantas a diferentes formas de estresse ou infecções patogênicas. Quando as células vegetais percebem as moléculas de etileno, desencadeiam processos de resposta ao estresse, levando à senescência as células próximas ao sítio de produção de etileno e causam a abscisão de frutos ou folhas, o desenvolvimento de doenças e a inibição do crescimento vegetal (LUVIZOTTO, 2008). Com isso, é de interesse que bactérias promotoras de crescimento vegetal possam controlar os níveis de etileno endógeno nas plantas.

9.6. Fatores que afetam a FBN de Bactérias Associativas

As bactérias diazotróficas, tanto simbióticas quanto associativas ou de vida livre, desempenham um papel importante na regulação das taxas de fixação de N nos ecossistemas. A taxa de nitrogênio fixado pode ser potencialmente afetada por diversos fatores como: temperatura, umidade, concentrações e disponibilidade de P, Mo, N e C (REED et al., 2011). Alguns estudos têm demonstrado também que variações da concentração e disponibilidade de C e P e do pH estão correlacionadas com variações na composição das comunidades diazotróficas e diferenças nas taxas de FBN (TENG et al., 2009).

Os mecanismos de controle bióticos ou abióticos da FBN associativa estão intimamente ligados com a funcionalidade do ecossistema, e as taxas de FBN nos mesmos diferem em função da variabilidade da distribuição dos microrganismos no ambiente e da heterogeneidade espacial e temporal dos atributos físicos e químicos (REED et al., 2011). Comumente a distribuição espacial da FBN de vida livre está associada com *hotspots* de atividade. Nesses *hotspots* de FBN ocorre maior intensidade e estabilidade devido à maior diversidade populacional de diazotróficos (REED et al., 2010). A variação temporal nas taxas de FBN de vida livre é comum. Variações entre as estações do ano são muito significativas e geralmente associadas à variação da luz, temperatura e precipitação (HEDIN, 2009; STEWART et al., 2011).

Esta grande variabilidade espacial e temporal da FBN realizada por organismos não-simbióticos se dá principalmente pela exposição dos promotores deste processo à heterogeneidade e ao dinamismo do ambiente. Isto torna os organismos realizadores da FBN sujeitos a esta modulação ambiental, o que não ocorre na interação entre rizóbios e leguminosas. Desta forma, é de esperar que este processo seja sempre menos eficiente do que o observado na interação simbiótica para o suprimento de nitrogênio assimilável à planta hospedeira.

9.7. Considerações Finais

Certamente, os microrganismos capazes de realizar a FBN de forma independente da associação com as plantas possuem um papel ambiental muito maior do que aquele desempenhado pelos fixadores simbióticos. Por terem sua ocorrência e atividade não limitada às plantas hospedeiras, os organismos fixadores de vida livre possuem outras funcionalidades ambientais como, por exemplo, seu uso como bioindicadores de alterações ambientais, ou sua ampla aplicação em processos de biorremediação,

com destaque para aqueles relacionados à degradação de poluentes ambientais ricos em carbono.

No entanto, sua ocorrência em uma ampla diversidade de organismos, atuante sob diversas bases metabólicas e sob diferentes condições ambientais, faz com que seu detalhado conhecimento e utilização sejam ainda dependentes de um maior número de estudos, que deem base à exploração racional e otimizada deste processo microbiano.

9.8. Estudo De Caso

Você acabou de ser contratado por uma empresa de bioinoculantes para gramíneas. Sua função dentro da empresa é desenvolver um produto à base de bactérias fixadoras de nitrogênio de vida livre que promova o crescimento da planta por meio da disponibilização de nitrogênio. Explique como você faria a produção deste bioinoculante desde a obtenção de uma estirpe eficiente até a produção em larga escala.

Referências

ADAMS, D.G.; DUGGAN, PS. Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria. **New Phytologist**, Cambridge, v. 144, p. 3–33, 1999.

ANDREOTE, F.D.; GUMIERE, T.; DURRER, A. Exploring interactions of plant microbiomes. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 71, p. 528-539, 2014.

AZEVEDO, J.L. et al. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **EJB: Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 3, n. 1, p. 40 – 65, 2000.

BALDANI, V.L.D. **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e, ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica.** 1996. 290 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1996.

BALDANI, V.L.D. et al. *Burkholderia brasiliensis* sp. nov., uma nova espécie de bactéria diazotrófica endofítica. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 69, p. 116, 1997.

CANUTO, E.L. et al. Respostas de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar à inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas. **Revista Agronomia**, Seropédica, v. 37, n. 2, p. 67-72, 2003.

CUSACK, D.F.; SILVER, W.; McDOWELL, H. Biological nitrogen fixation in two tropical forests: ecosystem-level patterns and effects of nitrogen fertilization. **Ecosystem**, New York, v. 12, p. 1299-1315, 2009.

DÖBEREINER, J. Sobre a ocorrência de Beijerinckia em alguns estados do Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 19, p.151-160, 1959.

DODDS, W.K.; GUDDER, D.A.; MOLLENHAUER, D. The ecology of Nostoc. **Journal of Phycology**, New York, v. 31, p. 2-18, 1995.

ESTRADA BONILLA, G.A. **Efeito da inoculação de bactérias mobilizadoras de fósforo na compostagem e no desenvolvimento da cana-de-açúcar**. 2015. 122 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

GARCÍA DE SALAMONE, I.E. et al. Biological nitrogen fixation in Azospirillum strain - maize genotype associations as evaluated by the ¹⁵N isotope dilution technique. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 23, p. 249-256, 1996.

HARDOIM, P.; OVERBEEK, L. VAN; ELSAS, J. VAN. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 16, p. 463-471, 2008.

HEDIN, L.O. et al. The nitrogen paradox in tropical forest ecosystems. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, Palo Alto, v. 40, p. 613-635, 2009

JAMES, K.J.; COXSON, D.; GROGAN, P. Nitrogen inputs by associative cyanobacteria across a low arctic tundra landscape. **Arctic Antarctic and Alpine Research**, Boulder, v. 43, n. 2, p.267-278, 2007.

KENNEDY, I.R.; TCHAN, Y.T. Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: recent advances. **Plant and Soil**, Hague, v. 141, p. 93-118, 1992.

KLOEPPER, J.W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R.M. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 7, p. 39-43, 1989.

KNAUTH, S. et al. Influence of different *Oryza* cultivars on expression of nifH gene pools in roots of rice. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 7, p. 1725–1733, 2005.

LUVIZOTTO, D.M. **Caracterização Fisiológica e Molecular de *Burkholderia* spp. associadas às raízes de cana-de-açúcar**. 2008. 94 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 63, p. 541–556, 2009.

MOREIRA, F.M.S. et al. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, Teresina, v. 2 p. 74-99, 2010.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

OLIVARES, F.L. et al. Infection of mottled stripe disease: susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytologist**, Cambridge, v. 135, p. 723–737, 1997.

POLIDORO, J.C. **O molibdênio na nutrição nitrogenada e na contribuição da fixação biológica do nitrogênio associada à cultura da cana-de-açúcar**. 2002. 185 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2002.

PRASANNA, R. et al. Cyanobacteria-PGPR interactions for effective nutrient and pest management strategies in agriculture. In: SATYANARAYANA, T.; JOHRI, B.N.; PRAKASH, A. (Ed.). **Microorganisms in sustainable agriculture and biotechnology**. Dordrecht: Springer, 2012. p. 173–195.

REED, M.S.; DOUGILL, A.J.; TAYLOR, M.J. Integrating local and scientific knowledge for adaptation to land degradation: Kalahari rangeland management options. **Land Degradation and Development**, Amsterdam, v. 18, p. 249–268, 2007.

REED, M.S. et al. Cross-scale monitoring and assessment of land degradation and sustainable land management: a methodological framework for knowledge management. **Land Degradation and Development**, Chichester, v. 22, p. 261-271, 2011.

REED, S. et al. Microbial community shifts influence patterns in tropical forest nitrogen fixation, **Oecologia**, Berlin, v. 164, p. 521–531, 2010.

REIS, R.A.; RODRIGUES, L.R.A.; RESENDE, K.T. Avaliação de fontes de amônia para o tratamento de fenos de gramíneas tropicais. 1. Constituintes da parede celular, poder tampão e atividade ureática. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 3, p. 682-686, 2001.

SALA, V.M.R. et al. Resposta de genótipos de trigo à inoculação de bactérias diazotróficas em condições de campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 6, p. 833-842, 2007.

_____. Novas bactérias diazotróficas endofíticas na cultura do trigo em interação com a adubação nitrogenada, no campo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 1099-1106, 2008.

STARKS, T.L.; SHUBERT, L.E.; TRAINOR, F.R. Ecology of soil algae: a review. **Phycologia**, Oxford, v. 20, p. 65-80, 1981.

STEWART, K.J.; COXSON, D.; GROGAN, P. Nitrogen inputs by associative cyanobacteria across a low arctic tundra landscape. **Arctic Antarctic and Alpine Research**, Colorado, v. 43, n. 2, p. 267–278, 2011.

TENG, Q. et al. Analysis of *nifH* gene diversity in red soil amended with manure in Jiangxi, south China, **The Journal of Microbiology**, London, v. 47, p. 135–141, 2009.

WELLER, D.M.; THOMASHOW, L.S. Current challenges in introducing beneficial microorganisms into the rhizosphere. In: O'GARA, F.; DOWLING, D.N.; BOESTEN, B. (Ed.). **Molecular ecology of rhizosphere microorganisms: biotechnology and the release of GMOs**. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, 1994. p. 1-18.

ZHUANG, X.L. et al. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. **Environment International**, New York, v. 33, p. 406–413, 2007.

CAPÍTULO 10

TRANSFORMAÇÕES MICROBIANAS DO FÓSFORO

Daniel Bini, Maryeimy Varón Lopez

10.1. Introdução

O fósforo (P) é um dos 17 elementos essenciais para o crescimento vegetal (RAGHOTHAMA, 1999). Seu papel na planta está associado a processos de produção de energia (ATP), fotossíntese e respiração, além de participar na síntese e composição de ácidos nucleicos, membrana celular, reações de óxido-redução, ativação/inativação de enzimas, entre outros (HISINGER, 2001). É um elemento essencial finito, o qual tende a ser estabilizado no solo, e que não apresenta aspectos de mudança de estado de oxidação ou formas gasosas na atmosfera, como aquelas observadas nas transformações do carbono (C), nitrogênio (N) e enxofre (S).

No solo, o P é pouco móvel sendo encontrado basicamente na forma orgânica (Po) e na fração inorgânica (Pi), representada principalmente pelo fosfato ($H_2PO_4^-$), que é a forma predominante na solução do solo e assimilável pelas plantas e microrganismos do solo. A baixa mobilidade e alta tendência à adsorção em óxidos de Fe e Al torna o P deficiente na maior parte dos solos brasileiros.

A dinâmica do P no solo tem sido alvo de muitos estudos, a fim de associar sua disponibilidade a sistemas de manejo eficientes em produção e decomposição de resíduos, com o intuito de aumentar a produtividade das culturas e as entradas de P ao solo, dando base a um decréscimo no uso de fertilizantes. O conhecimento das transformações do P por meio da microbiota do solo pode auxiliar neste ponto, promovendo melhorias e maior sustentabilidade dos plantios.

10.2. Ciclagem do Fósforo no Solo

O ciclo do P é caracteristicamente sedimentar, ou seja, este elemento não apresenta componentes gasosos na sua ciclagem (STEVENSON, 1994) (Figura 10.1). Os principais reservatórios do íon fosfato (PO_4^{3-}) são as rochas, nas quais o P permanece ligado por um longo tempo, caracterizando, portanto, uma forma de P não disponível. A fonte primária de Pi é de rochas contendo formas de apatita (Tabela 10.1). Com o passar dos anos, por processos geoquímicos, estas rochas sofrem degradação e são transformadas em solo por meio de um conjunto de fenômenos físicos e químicos (intemperismo), com possível liberação de PO_4^{3-} . Na solução do solo, o íon fosfato pode ser absorvido pelos vegetais e microrganismos, os quais o utilizam para formar compostos orgânicos (conversão de Pi para Po). Essas formas orgânicas (deposição na liteira, rizodeposição e/ou morte vegetal) são posteriormente decompostas pela microbiota do solo, com conseqüente retorno para a forma inorgânica. O Pi pode novamente ser absorvido pela microbiota (biomassa microbiana), assimilado por plantas e /ou fixado no solo (figura 10.1). Por ser solúvel, o PO_4^{3-} pode ser facilmente carregado pelas chuvas até as águas dos mares e dos rios e pode causar eutrofização desses ambientes.

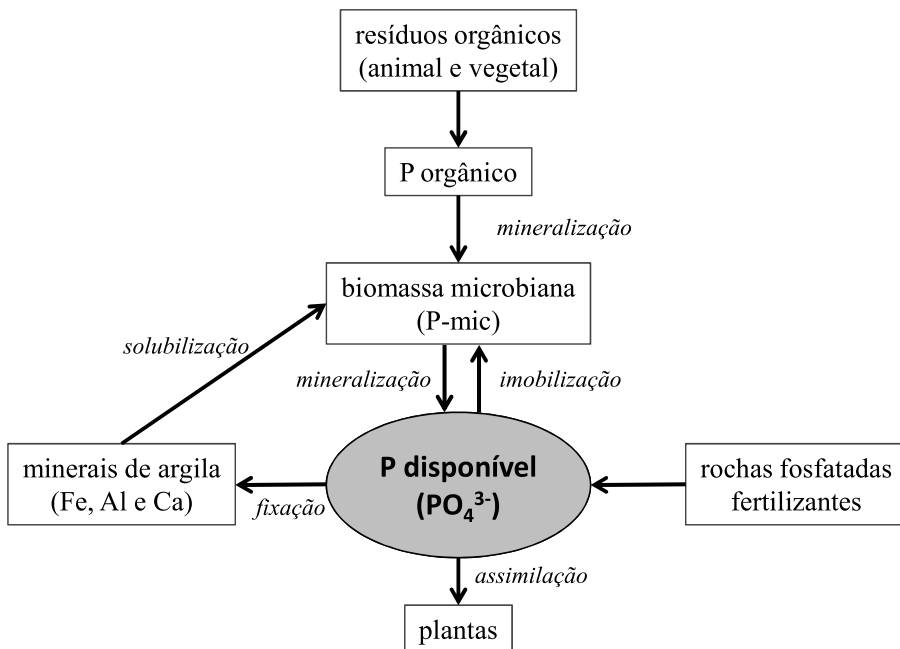


Figura 10.1 - Esquema geral da ciclagem de P no solo.

No solo o P pode ser fixado, tornando-se indisponível para as plantas, devido à estabilização desse elemento junto aos minerais de argila, ou devido à sua precipitação na presença de óxidos de ferro e alumínio, os quais ocorrem principalmente em solos tropicais. Neste aspecto, a ação de microrganismos solubilizadores de P no solo é importante para a reposição de P disponível (figura 10.1). Assim, a ciclagem do P envolve o solo, as plantas e os microrganismos.

Tabela 10.1 - Reservatórios naturais de fósforo na biosfera (Stevenson, 1994)

| Reservatórios de P | P total x 10 ¹² (kg) |
|-----------------------|---------------------------------|
| ----- Oceanos ----- | |
| Sedimentos | 840.000 |
| Dissolvido (Pi) | 80 |
| Profundeza (detritos) | 0,65 |
| Biota | 0,050-0,12 |
| ----- Terrestre ----- | |
| Solo | 96-160 |
| Rochas fosfáticas | 19 |
| Biota | 2,6 |
| Água doce | 0,09 |

10.3. Formas de P no Solo

A dinâmica do fósforo no solo está associada a fatores ambientais que controlam a atividade dos microrganismos e as propriedades físicas, químicas e mineralógicas do solo, de forma que o solo pode ser fonte ou dreno de P. Solos jovens e/ou moderadamente intemperizados (Vertissolos, Chernossolos, Neossolos) podem atuar como fonte, já que nestes ainda

ocorrem formas de P em minerais primários, embora formas de Po ou Pi sejam predominantes (SANTOS et al., 2008). Já solos com alto grau de intemperização (como os Latossolos) apresentam as formas de Pi ligadas à fração mineral com alta energia e as formas orgânicas estabilizadas física e quimicamente, sendo considerados drenos de P. Para entender como os microrganismos atuam na ciclagem de P no solo deve-se conhecer as formas de P e suas interações com os organismos do solo.

O P total compreende as frações do P localizadas na solução ou na fase sólida do solo. De modo simplificado pode-se considerar as formas de P do solo como: P inorgânico (Pi), P orgânico (Po) e P microbiano (P-mic). Essas formas podem ser consideradas lábeis (trocáveis) ou não lábeis (não-trocáveis) em função da fase em que se encontram (como sólido ou em solução). A seguir, segue uma rápida caracterização de cada fração:

P-inorgânico (Pi): caracterizado pelas formas de P-lábil (P-disponível) e P-não-lábil (P-indisponível). O P-disponível é o P solúvel, assimilável por plantas e microrganismos do solo. Encontra-se na solução do solo nas formas de ácido fosfórico (H_3PO_4), ácido ortofosfórico ($H_2PO_4^-$), ácido monofosfórico (HPO_4^{2-}) e íon fosfato (PO_4^{3-}), sendo que a presença e predominância de cada uma é dependente do pH da solução do solo (Figura 10.2.).

A quantidade de fosfato na solução do solo é muito baixa na maioria dos solos tropicais, sendo sua concentração mais comum em torno de 1,0 mM (0,03 ppm), que corresponde a um teor crítico abaixo do qual a absorção pelas plantas é muito difícil. Esses menores teores de P-lábil são decorrentes da alta fixação de Pi por minerais de argila (caulinita em solos brasileiros) e óxidos de Fe e Al. Essa fixação de P categoriza o P-não-lábil (P indisponível) do solo, uma vez que constitui a fase sólida no solo e, assim, não assimilável pelas plantas.

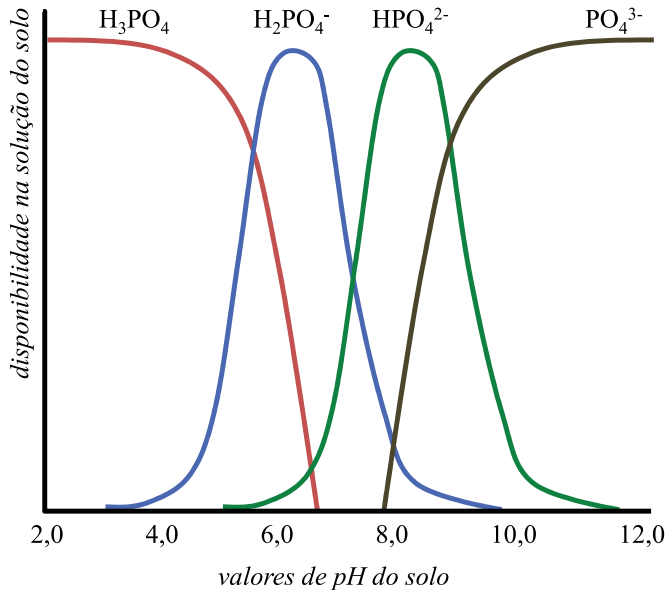


Figura 10.2 - O esquema mostra a forma de P mais abundante em cada valor de pH.

Frequentemente há necessidade de solubilização de P da fase sólida para a solução, para suprir as necessidades das culturas. Naturalmente, essa disponibilização depende do pH, do teor de óxidos, da atividade microbiana e de outros fatores que alteram o equilíbrio de P da fase sólida/P solução (ANGHINONI; BISSANI, 2004; PAVINATO 2008). No entanto, devido à necessidade de grande produção de grãos em pouco tempo, o incremento de P por meio da fertilização fosfatada com fosfatos solúveis é muito utilizado. Neste caso, o objetivo é gerar concentrações de Pi na solução do solo variando de 0,3 a 3,0 ppm, constituindo a faixa ótima de absorção de P pela maioria das culturas. Contudo, muito do fósforo utilizado na fertilização é fixado na fase sólida do solo.

P-orgânico (Po): Estima-se que o Po represente em torno de 5 a 40% do P total do solo (RHEINHEIMER; ANGHINONI, 2003; SANTOS et al., 2008), composto de valores entre 1 e 3% da matéria orgânica. Além disso, o Po mantém, de maneira geral, razões variáveis com o C orgânico e outros nutrientes do solo, sendo em média de 5 a 20 para N/P e de 100 a 300 para C/P, fatores estes que podem determinar a imobilização ou a mineralização de P no solo pela microbiota.

O fósforo orgânico é oriundo dos resíduos vegetais depositados no solo, da biomassa microbiana e dos produtos de sua decomposição (MARTINAZZO et al., 2007). Estima-se que o tecido vegetal geralmente contém 0,05 a 0,5% de P.

No solo, as principais formas de Po estão em moléculas como os fosfatos diésteres (ácidos nucleicos e fosfolipídios), são bastante suscetíveis ao ataque microbiano e representam uma fonte lábil de P (Tabela 10.2). Compostos que possuem alta carga residual, como os fosfatos monoésteres (fosfatos de inositol) são fortemente adsorvidos aos colóides inorgânicos (óxidos de Fe, Al e Ca) e permanecem protegidos química e fisicamente do ataque microbiano, dificultando a mineralização e favorecendo o seu acúmulo no solo (STEWART; TIESSEN, 1987; HINSINGER, 2001). Devido a essas propriedades, a manutenção da matéria orgânica do solo em sistemas agrícolas pode estabilizar os óxidos de Fe e Al, impedindo a fixação de Pi na fase sólida do solo (HINSINGER, 2001; VANCE, 2003).

P-microbiano (P-mic): constitui uma fração muito variável de Po do solo, a qual representa, em média, de 1 a 10% do P total, (RICHARDSON, 1994) e de 2 a 24% do Po (BROOK et al., 1984). De maneira geral, a

Tabela 10.2 - Formas de fósforo orgânico no solo, estimadas em relação ao fósforo orgânico total (Stevenson, 1994)

| Formas de Po no solo | % |
|----------------------------------|----------|
| Fosfato de inositol | 10 – 80 |
| Fosfolipídeos | 0,5 a 7 |
| Ácidos nucleicos | 3 |
| Fosfoproteínas | traços |
| Fosfatos metabólicos (ATP, etc.) | traços |

biomassa microbiana é considerada matéria orgânica de rápida ciclagem (KASCHUK et al., 2010) e pode ser dreno ou fonte de P. Muitas formas de Po encontradas no solo, como fosfolipídios e ácidos nucleicos, são de origem microbiana (STEVENSON, 1994).

Mesmo o P-microbiano não sendo prontamente disponível para as plantas, este é um reservatório dinâmico do P nos solos. Assim, quanto mais pobre em P disponível for o sistema, maior é a dependência das formas orgânicas, sobretudo do P armazenado na biomassa microbiana que absorve e imobiliza P da solução do solo e o libera gradativamente (GATIBONI et al., 2008).

De modo geral, ao longo do uso do solo para a produção vegetal, as formas lábeis de P diminuem e as formas não-lábeis aumentam, sobretudo as inorgânicas. Neste aspecto, a importância do Po aumenta e os processos biológicos orquestrados pelos microrganismos do solo tornam-se protagonistas na disponibilização de P para as plantas e outros organismos do solo (CROS; SCHLESINGER, 1995, PAVINATO 2008).

10.4. Transformações Microbianas do P no Solo

Bactérias e fungos estão envolvidos nos processos de solubilização e mineralização de P no solo, desempenhando um importante papel no ciclo biogeoquímico desse elemento (Richardson, 2001). Soma-se a isso o fato de que os microrganismos podem modificar a forma na qual as plantas adquirem P do solo, por exemplo: por meio da colonização das suas raízes por fungos micorrízicos, liberação de fitormônios (que promovem o crescimento de raízes), estímulo à excreção de ácidos orgânicos e íons hidrogênio, produção de sideróforos e produção de enzimas fosfatases. No entanto, neste capítulo serão abordados apenas os processos de transformações microbianas de P no solo regidos por: 1) solubilização de P ligado aos óxidos e argila; 2) mineralização de Po e imobilização de P. No capítulo 12 serão apresentadas as características das micorrizas.

10.4.1. Microrganismos responsáveis pela Solubilização de P

A presença de microrganismos solubilizadores, ou também chamados de mobilizadores de P, tem sido constatada na maioria dos solos investigados (JONES et al., 1991; NAHAS et al., 1994, ESTRADA, 2015). Além disso, o tipo de solo, a idade e a espécie de planta afetam o processo de solubilização (Odufa e Oso, 1978), sendo que leguminosas e gramíneas apresentam grande incidência de microrganismos solubilizadores de P em sua rizosfera e, conseqüentemente, nos solos cultivados com estas plantas (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982).

O mecanismo da solubilização do Pi adsorvido, (fixado) nos minerais de argila e/ou óxidos de Fe e Al no solo está relacionado principalmente com a produção e liberação de ácidos orgânicos e ácidos inorgânicos produzidos por plantas e microrganismos. Em particular, os microrganismos envolvidos na solubilização do Pi excretam ácidos orgânicos (lático, glicólico, cítrico, oxálico, málico, succínico e tartárico) e seus prótons associados, que atuam dissolvendo diretamente o material fosfatado ou quelando os cátions (Ca, Mg, Fe, Al, Mn e Zn) que acompanham o ânion fosfato, liberando-o no sistema (RICHARDSON et al., 2011; HU et al., 2009; MAHDI et al., 2011) (Figura 10.3). Essa propriedade quelante é mais relacionada aos hidroxíácidos, compostos aromáticos, açúcares ácidos e substâncias húmicas. Neste caso, a qualidade do ácido orgânico liberado é mais relevante que a quantidade.

Os ácidos inorgânicos também podem contribuir para a solubilização de P, muitos deles provenientes de processos microbianos. Neste caso, os processos de oxidação do N-amoniacal e do enxofre, além da respiração microbiana e de raízes podem produzir ácidos (ácidos nítrico, sulfúrico e carbônico, respectivamente) que podem atuar sobre as rochas fosfatadas e levar ao aumento do Pi lábil no solo.

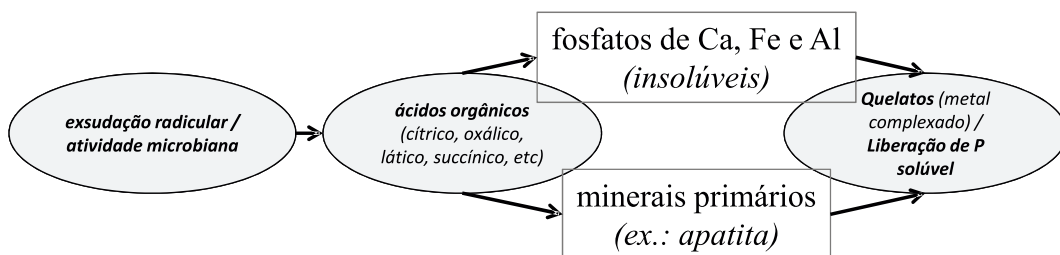


Figura 10.3 - Mecanismos de solubilização de fósforo no solo.

A capacidade de liberar ácidos (orgânicos e/ou inorgânicos) para o meio caracteriza os microrganismos solubilizadores de P no solo. Entre as bactérias, os gêneros *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Erwinia*, entre outros, são capazes de solubilizar P devido à produção de ácidos orgânicos (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1997; KHAN et al., 2007; MAHDI et al., 2011). Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são os representantes de fungos mais conhecidos na produção de ácidos orgânicos e são eficientes solubilizadores de P (SABER et al., 2009; COUTINHO et al., 2012). Esses fungos apresentam também a capacidade de solubilizar P proveniente de fertilizantes fosfatados (COUTINHO et al., 2012).

Podemos destacar também a atuação dos fungos ectomicorrízicos associados às raízes das plantas, os quais apresentam grande capacidade de mobilizar P do solo, sendo extremamente benéficos às plantas, em virtude de produzirem as condições necessárias para a solubilização de P, como: produção e liberação de ácidos orgânicos, aumento da concentração de CO₂ na rizosfera, aumento das populações de bactérias solubilizadoras de P, produção de agentes quelantes e estímulo à atividade das fosfatases (veja capítulo 4). Entretanto, para os fungos micorrízicos arbusculares verificou-se que estes não atuam na solubilização de compostos de P, porém suas hifas apresentam grande afinidade pelos íons fosfato, eles exploram um volume de solo muito maior que a raiz e também atuam na produção de fosfatases (SILVEIRA; CARDOSO, 2004) (ver capítulo 12).

Muitos trabalhos demonstram a capacidade de bactérias e fungos em solubilizar P em condições laboratoriais (*in vitro* e em experimentos conduzidos em casa de vegetação), com aumento no crescimento vegetal e maior concentração de P nos tecidos vegetais. No entanto, quando esses modelos são levados para campo resultados inconsistentes são observados (JAKOBSEN et al., 2005; KHAN et al., 2007, 2010; HARVEY et al., 2009; ZAIDI et al., 2009). Isso é atribuído a vários fatores, como à falta de persistência e competitividade dos microrganismos introduzidos no solo e ao pouco conhecimento sobre os fatores que afetam o desenvolvimento destes microrganismos, da planta ou dos dois em condições naturais (RICHARDSON, 2001; KHAN et al., 2007; ZAIDI et al., 2009). Além disso, deve-se considerar o tipo de solo, uma vez que a mineralogia e química dos solos influenciam negativa- ou positivamente a ciclagem de P.

10.4.2. Microrganismos atuantes na Mineralização e Imobilização de P

A matéria orgânica do solo pode ser considerada uma fonte importante de P para as plantas e microrganismos. A utilização do Po como fonte de P pelas plantas pode ser maximizada quando resíduos vegetais são lentamente decompostos, proporcionando um sincronismo entre a disponibilidade de Pi e o crescimento da planta, com menos perda por adsorção no solo (Figura 10.3).

O processo de mineralização do P consiste na transformação da forma orgânica para fósforo solúvel, promovida pela ação de hidrolases liberadas pelas raízes de plantas e microrganismos, sendo que estas são denominadas fosfatases (REJSEK et al., 2012).

As fosfatases são enzimas extracelulares que catalisam monoésteres em uma faixa de pH ótimo. Para tanto, as fosfatases são classificadas como ácidas (pH ótimo em torno de 6,5) ou alcalinas (pH ótimo em torno de 11) (REJSEK et al., 2012). A fosfatase ácida é produzida tanto por microrganismos (principalmente fungos) quanto por plantas, enquanto que a atividade da fosfatase alcalina nos solos parece ser atribuída totalmente aos microrganismos ((NAKAS et al., 1987; TARAFDAR et al., 1988)).

Quando essas enzimas atuam sobre o substrato inositol-hexafosfato, são denominadas fitases. No entanto, a ação da fitase é muito dificultada, uma vez que o inositol-hexafosfato é fortemente adsorvido aos colóides do solo e protegido da ação enzimática, conforme comentado anteriormente. Formas mais lábeis de P orgânico como os ácidos nucleicos e fosfolipídios são mais facilmente mineralizados pelas fosfatases, sendo estas as formas mais representativas de mineralização de P no solo.

A produção das fosfatases é resultado de modificações bioquímicas a nível celular, desencadeadas primordialmente pela diminuição da absorção de P pelos microrganismos (RHAGHOTHAMA, 1999), o que explica o aumento da sua atividade no solo quando os sistemas têm baixos teores de P disponível (OBERSON et al., 1996; CONTE, 2001). Estima-se que cerca de 30 a 50% dos isolados de microrganismos do solo apresentam atividade de fosfatase. Por exemplo, bactérias fixadoras de N, como os rizóbios do feijão, apresentam grande capacidade de produzir fosfatases, quando em condições de deficiência de P, a fim de manter altas concentrações de P nos nódulos em virtude da alta necessidade desse nutriente para a fixação biológica de nitrogênio (ARAÚJO et al., 2008).

Alguns autores afirmam que a mineralização do Po acompanha a mineralização do C orgânico (TIESSEN et al., 1992), enquanto outros (MCGILL; COLE, 1981) propõem que a mineralização do P pode também ocorrer de forma independente da mineralização das estruturas carbonadas. Neste aspecto, um ponto a ser considerado é a relação C/P da matéria orgânica. Em geral, resíduos com baixa relação C/P (200/1) favorecem a mineralização de P no solo. Em contrapartida, resíduos com relação C/P maior que 300/1 favorecem a imobilização do P pela biomassa microbiana. A taxa de imobilização de P vai depender da qualidade do resíduo em decomposição e da disponibilidade de carbono e nitrogênio no solo. Se a concentração de P no resíduo exceder à demanda celular poder-se-á observar um aumento de Pi disponível através da mineralização. Por outro lado, se este resíduo apresentar concentrações de P abaixo dos valores requeridos para a construção da biomassa microbiana, este deve ser suprido pelo Pi disponível na solução do solo, o que vai empobrecer a solução do solo em P. Geralmente as relações C/P encontradas em solos situam-se na faixa de 100 a 300/1, enquanto que a relação C/P da biomassa microbiana está próxima de 30/1 em bactérias.

A imobilização de P pelos microrganismos gera um compartimento do solo denominado de P microbiano (P-mic). O P absorvido pelos microrganismos tem função essencial na célula relacionada aos processos metabólicos (formação de estruturas orgânicas, fosfolipídios e ácidos nucléicos) e geração de energia (ATP). No solo, o P microbiano pode funcionar como um moderador dos fenômenos de adsorção, imobilizando temporariamente o fósforo e evitando assim sua adsorção específica e mais permanente aos colóides inorgânicos do solo (TATE et al., 1991; CONTE et al., 2001; MARTINAZZO et al., 2007).

10.5. Considerações Finais

É notória a importância do fósforo, tanto no ciclo biogeoquímico natural do planeta quanto nos ciclos antrópicos de produção de alimentos. É também fato que ambos os ciclos estão severamente comprometidos pelo descaso e desperdícios cometidos pelo homem no gerenciamento e disposição deste mineral. O P é considerado um recurso natural não renovável, de relativa escassez, pouco móvel e com alta tendência à fixação em solos tropicais. Estima-se que, se toda quantidade de P acumulado nos solos agrícolas através da fertilização fosfatada pudesse ser disponibilizada para as plantas, este seria suficiente para sustentar a

demanda dos plantios por aproximadamente 100 anos. Portanto, muitos solos podem apresentar valores de P total elevados, embora isso represente pouca vantagem, pois grande parte está presa ou fixada nos colóides do solo, não sendo fonte disponível de P para as plantas.

Atualmente, um número considerável de trabalhos tem sido desenvolvido num esforço de encontrar alternativas para suprir as necessidades de P para as plantas a um custo menor. Neste aspecto, a microbiota do solo é de fundamental importância para a ciclagem de P ocorrer nos ecossistemas, devido à capacidade de oxidação da matéria orgânica (mineralização) e solubilização de fosfato natural (inorgânico), fato este que foi negligenciado ou pouco relatado nos estudos e sistemas de manejo nas últimas décadas. Com relação à solubilização de P por microrganismos, estudos devem ser direcionados não apenas à identificação de grupos com esse potencial, mas também na análise da sua atuação diretamente no campo.

Práticas de manejo como o plantio direto e cultivo mínimo podem fornecer nutrientes e promovem melhorias nas condições biológicas e físicas do solo, com redução da fixação de fosfatos e aumento na eficiência dos fertilizantes aplicados em solos. Os atributos químicos e físicos aliados aos microbiológicos do solo podem auxiliar em tecnologias de cultivo mais eficientes, até mesmo na utilização de fertilizantes pelas culturas, prolongando a vida das reservas de fosfato e aumentando a produtividade agrícola. E, com certeza, a intensa utilização da micorriza pode contribuir para minorar o P total fixado em solos, disponibilizando parte desse para as plantas e contribuindo para diminuir as quantidades de adubos fosfatados aplicados.

10.6. Estudo de Caso

10.6.1. Estudo de Caso 1

Martinazzo et al. (2007), em estudos com rotação de culturas e doses de fósforo, observaram que a adubação fosfatada aumentou o teor de P na biomassa microbiana. No entanto, essa imobilização de P foi temporária, diminuindo ao longo do ciclo das culturas, e sua variação temporal não foi acompanhada por variações no teor de P disponível. Segundo estes autores, essas variações no P-microbiano em curto prazo podem ser consideradas uma forma de retardar a adsorção do P aos colóides inorgânicos e melhorar o sincronismo entre mineralização e absorção

pelas plantas. Saunders e Metson (1971) sugerem que o armazenamento e a liberação do P pela biomassa microbiana podem explicar as mudanças sazonais na quantidade deste elemento na solução do solo.

Estudos utilizando isótopos marcados demonstraram que há um importante fluxo de P através da biomassa microbiana do solo, uma vez que de 2 a 25% do P marcado adicionado ao solo são recuperados pela microbiota (OEHL et al., 2001; OBERSON et al., 2002). Essa alta incorporação pode ser explicada pelo aumento da atividade microbiana, sendo que a ciclagem de P na ausência de mudanças no P microbiano sugere uma ação conjunta entre a imobilização e mineralização do P pela microbiota do solo. Além disso, a ciclagem do P microbiano e a concentração de P na solução do solo podem ser estreitamente relacionadas, uma vez que há uma diminuição da atividade de P na solução do solo com o aumento da biomassa microbiana, sendo a biomassa microbiana uma das responsáveis pelo controle das concentrações de P inorgânico e orgânico na solução do solo (SEELING; ZASOSKI, 1993).

Outros fatores que afetam a mineralização e imobilização de P estão vinculados a efeitos positivos ou negativos sobre a atividade microbiana, como: pH, aeração, temperatura, umidade, presença de plantas, adição de fertilizantes, entre outros.

10.6.2. Estudo de Caso 2

Um agricultor fez uma consulta em sua empresa sobre a possibilidade da utilização de pó de rocha fosfática em sua área de produção. As dúvidas que surgiram estão relacionadas à possibilidade de substituir a fosfatagem pela adição deste composto nas áreas de cultivo, e sobre as variáveis ambientais que levam à solubilização do fósforo contido neste material. Elabore um documento expondo estes pontos, e dando uma recomendação final ao produtor.

Referências

- ANGHINONI, I.; BISSANI, C.A. Fósforo e adubos fosfatados. In: BISSANI, C.A. et al. **Fertilidade dos solos e manejo da adubação de culturas**. Porto Alegre: Genesis, 2004. p. 117–138.
- ARAUJO, A.P.; PLASSARD, C.; DREVON, J.J. Phosphatase and phytase activities in nodules of common bean genotypes at different levels of phosphorus supply. **Plant Soil**, Hague, v. 312, p. 129-138, 2008.
- BROOKS, P.C.; POWLSON, D.S.; JENKISON, D.S. Phosphorus in the soil microbial biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 16, p. 169-175, 1984.
- CONTE, E. **Atividade de fosfatase ácida e formas de acumulação de fosfato em solo no sistema plantio direto**. 2001. 65 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.
- COUTINHO, F.P.; FELIX, W.P.; YANO-MELO, A.M. Solubilization of phosphates in vitro by *Aspergillus spp.* and *Penicillium spp.* **Ecological Engineering**, Oxford, v. 42, p. 85–89, 2012.
- CROSS, A.F.; SCHLESINGER, W.H. A literature review and evaluation of the Hedley fractionation: applications to the biogeochemical cycle of soil phosphorus in natural ecosystems. **Geoderma**, Amsterdam, v. 64, p.197–214, 1995.
- ESTRADA BONILLA, G.A. **Efeito da inoculação de bactérias mobilizadoras de fósforo na compostagem e no desenvolvimento da cana-de-açúcar**. 2015. 122 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.
- GATIBONI, L.C. et al. Fósforo da biomassa microbiana e atividade de fosfatases ácidas durante a diminuição do fósforo disponível no solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 8, p. 1085–1091, 2008.
- HARVEY, P.R.; WARREN, R.A.; WAKELIN, S. Potential to improve root access to phosphorus: the role of non-symbiotic microbial inoculants in the rhizosphere. **Crop and Pasture Science**, Victoria, v. 60, p. 144–151, 2009.

HINSINGER, P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes : a review. **Plant Soil**, London, v. 273, p. 173–195, 2001.

HU, J. et al. Population size and specific potential of P-mineralizing and P-solubilizing bacteria under long-term P-deficiency fertilization in a sandy loam soil. **Pedobiologia**, Jena, v. 53, p. 49–58, 2009.

JAKOBSEN, I.; LEGGETT, M.E.; RICHARDSON, A.E. Rhizosphere microorganisms and plant phosphorus uptake. In: SIMS, J.T.; Sharpley, A.N. (Ed.). **Phosphorus: agriculture and the environment**. Madison: American Society for Agronomy, 2005. p. 437–494.

JONES, D. et al. Phosphate solubilizing fungi in a Scottish upland soil. **Mycological Research**, Cambridge, v. 95, p. 1090–1093, 1991.

KASCHUK, G.; ALBERTON, O.; HUNGRIA, M. Three decades of soil microbial biomass studies in Brazilian ecosystems: lessons learned about soil quality and indications for improving sustainability. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 42, n. 1, p. 1–13, 2010.

KHAN, M.S. et al. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi current perspective. **Archives of Agronomy and Soil Science**, London, v. 56, p. 73–98, 2010.

KHAN, M.S.; ZAIDI, A.; WANI, P.A. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 27, p. 29–43, 2007.

MAHDI, S.S. et al. Phosphorus availability issue- its fixation and role of phosphate solubilizing bacteria in phosphate solubilization. **Research Journal of Agricultural Sciences**, New York, v. 2, n. 1, p. 174–179, 2011.

MARTINAZZO, R. et al. Fósforo microbiano do solo sob sistema plantio direto em resposta à adição de fosfato solúvel. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 31, p. 563-570, 2007.

MCGILL, W.B.; COLE, C.V. Comparative aspects of cycling of organic C, N, S and P through soil organic matter. **Geoderma**, Amsterdam, v. 26, p. 267–286, 1981.

NAHAS, E.; CENTURION, J.F.; ASSIS, L.C. Efeito das características químicas dos solos sobre os microorganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 18, p. 43-48, 1994.

NAKAS, J.P.; GOULD, W.D.; KLEIN, D.A. Origin and expression of phosphatase activity in a semi-arid grassland soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 19, p. 13-18, 1987.

OBERSON, A. et al. Microbiological processes in soil organic phosphorus transformations in conventional and biological cropping systems. **Biology and Fertility of Soils**, Heilderber, v. 21, p. 138-148, 1996.

ODUNFA, V.S.A.; OSO, B.A. Bacterial population in the rhizosphere soils of cowpea and sorghum. **Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol**, Paris, v. 15, n. 4, p. 413-420, 1978.

OEHL, F. et al. Kinetics of microbial phosphorus uptake in cultivated soils. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 34, n. 1, p. 31-41, 2001.

PAVINATO, P.S.; ROSOLEM, C.A. Disponibilidade de nutrientes no solo: decomposição e liberação de compostos orgânicos de resíduos vegetais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 911-920, 2008.

RAGHOTHAMA, K.G. Phosphate acquisition. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 665-693, 1999.

REJSEK, K. et al. Acid phosphomonoesterase (E.C. 3.1.3.2) location in soil. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Washington, v. 175, n. 2, p. 196-211, 2012.

RHEINHEIMER, D.S.; ANGHINONI, I. Accumulation of soil organic phosphorus by soil tillage and cropping systems in subtropical soils. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 34, n. 15/16, p. 2339-2354, 2003.

RICHARDSON, A.E.; HADOBAS, P.A.; HAYES, J.E. Extracellular secretion of *Aspergillus* phytase from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate. **Plant Journal**, Oxford, v. 25, p.1-10, 2001.

RICHARDSON, A.E. Soil microorganisms and phosphorus availability. In: PANKHURST, C.E. et al. (Ed.). **Soil biota: management in sustainable farming**. Melbourne: CSIRO, 1994. p. 50-62.

RICHARDSON, A.E.; SIMPSON, R.J. Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus. **Plant Physiology**, Washington, v. 156, n. 3, p. 989-96, 2011.

- RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, New York, v. 17, p. 319–339, 1999.
- SABER, W.I.A.; GHANEM, K.M.; EL-HERSH, M.S. Rock phosphate solubilization by two isolates of *Aspergillus niger* and *Penicillium sp.* and their promotion to mung bean plants. **Research Journal of Microbiology**, New York, v. 4, p. 235–250, 2009.
- SANTOS, D.R.; GATIBONI, L.C.; KAMINSKI, J. Fatores que afetam a disponibilidade do fósforo e o manejo da adubação fosfatada em solos sob sistema plantio direto. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 576–586, 2008.
- SAUNDERS, W.M.H.; METSON, A.J. Seasonal variation of phosphorus in soil and pasture. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v. 14, p. 307–328, 1971.
- SEELING, B.; ZASOSKI, R.J. Microbial effects in maintaining organic and inorganic solution phosphorus concentrations in a grassland top soil. **Plant Soil**, New York, v. 148, p. 227–284, 1993.
- SILVEIRA, A.P.D.; CARDOSO, E.J.B.N. Arbuscular mycorrhiza and kinetic parameters of phosphorus absorption by bean plants. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, n. 2, p. 203–209, 2004.
- STEVENSON, F.J. **Humus chemistry: genesis, composition, reactions**. 2nd ed. New York Wiley, 1994.
- STEWART, J.W.B.; TIESSEN, H. Dynamics of soil organic phosphorus. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 4, p. 41–60, 1987.
- SYLVESTER-BRADLEY, R. et al. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 12, n. 1, p. 15–22, 1982.
- TARAFDAR, J.C.; CLAASEN, N. Organic phosphorus compounds as a phosphorus source for higher plants through the activity of phosphatases produced by plant roots and microorganisms. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 5, p. 308–312, 1988.
- TATE, K.R. et al. Temporal variations in some plant and soil P pools in two pasture soils of different P fertility status. **Plant Soil**, New York, v. 132, p. 219–232, 1991.
- TIESSEN, H.; SALCEDO, I.H.; SAMPAIO, E.V.B. Nutrient and soil organic matter dynamics under shifting cultivation in semi-arid northeastern Brazil. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 38, p. 139–151, 1992.

VANCE, C.P.; UHDE-STONE, C.; ALLAN, D.L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. **New Phytologist**, Cambridge, v. 157, n. 3, p. 423–447, 2003.

ZAIDI, A. et al. Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, Budapest, v. 56, p. 263–284, 2009.

CAPÍTULO 11

TRANSFORMAÇÕES DO ENXOFRE

Maryeimy Varón Lopez, Daniel Bini, Marcus Venicius de Mello Lourenço

11.1. Introdução

O enxofre (S) é o décimo elemento mais abundante na terra, faz parte da constituição de aminoácidos (cisteína e metionina), de vitaminas, hormônios e de coenzimas e possui vários estados de oxidação, desde seu estado de maior redução (S^{2-} sulfeto) até seu estado de maior oxidação (SO_4^{2-} Sulfato). Na natureza, ele compõe aproximadamente 1% da matéria seca da célula bacteriana. O segundo grande reservatório está na forma de sulfato, encontrado nos oceanos (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001; HAVLIN et al., 2005, KERTESZ et al., 2007; TOSTEVIN et al., 2014). Possui grande importância nas reações químicas e biológicas nos diferentes ecossistemas, e seu ciclo se baseia na redução dissimilativa do sulfato, redução assimilativa (imobilização), respiração do enxofre elementar, oxidação e mineralização (MUYZER et al., 2008).

No solo, o enxofre pode ser encontrado sob a forma de minerais primários (sulfeto de ferro e gesso), pirita (FeS_2), gipsita ($CaSO_4$), e ainda associado a combustíveis fósseis, deposição atmosférica (poeira), nas chuvas (chuva ácida), nos resíduos vegetais e animais, pesticidas, fertilizantes ou na forma de íons sulfato. Essas diferentes formas são o reflexo da variabilidade no potencial redox apresentada por esse elemento, indo do -2 (completamente reduzido) ao +6 (completamente oxidado) (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001).

De modo geral, o sulfato (SO_4^{2-}) é a forma presente na solução do solo e assimilável por plantas e microrganismos. No entanto, outras formas oxidadas e reduzidas são características deste elemento no solo, sendo o conhecimento de como se originam essas formas de fundamental importância para o manejo de culturas agrícolas e florestais. (SCHERER, 2001; de KOK et al., 2005).

O Brasil importa 90% do enxofre elementar (S_0) que consome, devido à pequena produção nacional. O S é altamente utilizado na agricultura brasileira (aproximadamente 53% do total), seguido das indústrias químicas, que utilizam os outros 47% para a produção de ácido sulfúrico (parcialmente empregado na produção de fertilizantes).

No solo, o enxofre sofre uma série de transformações biogeoquímicas, a maioria promovida por microrganismos, que resultam na ciclagem do enxofre. O ciclo do enxofre vem recebendo mais atenção devido aos possíveis problemas ambientais decorrentes da intensa utilização de combustíveis fósseis, gerando formas ácidas para a atmosfera, as quais têm causado grandes problemas. O objetivo deste capítulo é apresentar as principais formas de S do solo e relacioná-las aos processos microbianos envolvidos na oxidação e redução deste elemento.

11.2. O S no solo

O enxofre pode ser encontrado em grandes quantidades na crosta terrestre, em rochas sedimentares e na água do mar, mas o maior reservatório é o solo. No solo este pode ocorrer sob formas orgânicas e inorgânicas, sendo a sua disponibilidade dependente das características físicas e químicas do solo, como: pH, drenagem, composição mineralógica, teor de matéria orgânica, quantidade e qualidade de resíduos orgânicos e profundidade do perfil do solo (SCHERER, 2009).

As formas orgânicas do enxofre correspondem a 85-90% do total de S encontrado nos solos, principalmente na biomassa e em resíduos orgânicos. Entre os principais compostos temos os ésteres de sulfato ($-\text{O}-\text{SO}_3\text{H}$) e os radicais sulfidrilas ($-\text{SH}$ ou $-\text{S}-\text{S}$). Uma alta quantidade de S é encontrada na biomassa microbiana, representando de 1 a 3% do total do S orgânico no solo. Nos microrganismos o teor de S varia de 1 a 10 mg kg^{-1} de matéria seca e a relação C/S de 60 a 85 para as bactérias e de 180 a 230 para fungos. Aproximadamente 90% do S-org estão ligados ao carbono em forma de aminoácidos (C-S) ou na forma de éster (C-O-S). Os aminoácidos

representam 30% do S-org do solo e os ésteres sulfatados constituem entre 20 e 65% do S orgânico total. A relação carbono/enxofre (C/S) da matéria orgânica varia de 100 a 200:1, sendo esta variação relacionada ao tipo de solo. Para os resíduos vegetais pode ser encontrada uma relação C/S de 150 a 450 nas áreas florestais e nos solos agrícolas uma relação C/S média de 90:1 (FRENEY, 1967; TABATABAI, 1984; ERIKSEN, 2008).

Já as formas inorgânicas correspondem a 10-15% do enxofre total do solo, onde grande quantidade deste elemento ocorre sob a forma de sulfeto de ferro ou pirita (FeS_2), gipsita (CaSO_4) ou sulfato (SO_4^{2-}), este último presente na solução do solo. Nos solos, o S-inorgânico pode se apresentar em vários estados de oxidação (2-, 0, 2+, 4+ e 6+), com maior frequência dos estados 2-, 0 e 6+, sendo estes correspondentes às formas de S^{-2} , S^0 e SO_4^{2-} (SUZUKI, 1999). Nos solos bem drenados, nos calcários de regiões áridas e semiáridas, em cinzas vulcânicas e na solução do solo a maior parte de S-inorgânico encontra-se na forma de SO_4^{2-} . Nas áreas de pântano ou adsorvidas às partículas de argila ou nos complexos organominerais encontram-se formas reduzidas como dióxido de enxofre (SO_2), SO_3^{2-} (tóxico para os organismos). Em condições anaeróbias, o SO_4^{2-} é reduzido a S^{-2} , sendo o H_2S a forma principal, um gás altamente volátil e caracterizado com odor forte (MUYZER; STAMS, 2008).

11.3. O ciclo do enxofre

De maneira simplificada, o ciclo do enxofre pode ser descrito como apresentado na Figura 11.1. O SO_4^{2-} é usado comoceptor final de elétrons pelos microrganismos redutores de SO_4^{2-} durante a degradação da matéria orgânica (1). A redução de SO_4^{2-} produz S^{-2} e posteriormente sulfeto de hidrogênio (H_2S) (2). Como produto da redução de SO_4^{2-} , o S^{-2} pode ser posteriormente oxidado pelos organismos quimiolitotróficos para enxofre elementar (S^0) (3) e adicionalmente até SO_4^{2-} (4). O SO_4^{2-} também pode ser derivado da deposição atmosférica de óxidos de enxofre (5) que são formados da oxidação química de H_2S (6). Subsequentemente, o SO_4^{2-} pode ser absorvido como um nutriente requerido pelos muitos seres vivos (plantas e microrganismos) para formar S-org. (7) ou pode ser novamente reduzido pelos microrganismos redutores de sulfato para S^{-2} (2). Outra biotransformação no ciclo do S inclui a redução do S^0 para S^{-2} (8) e/ou a oxidação para SO_4^{2-} (9) (Figura 11.1).

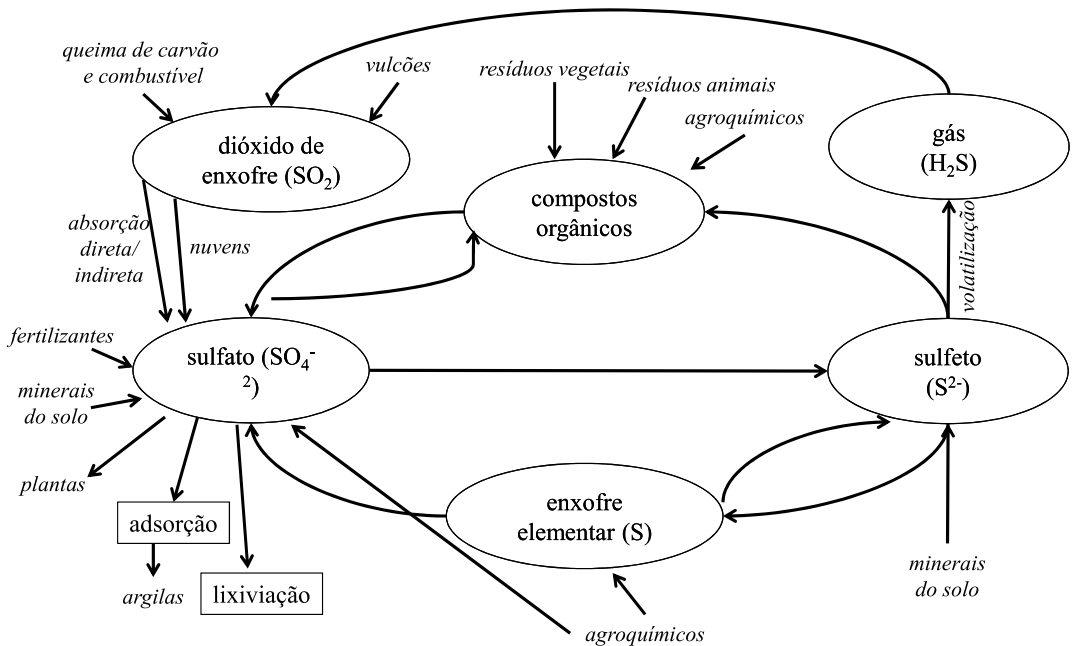


Figura 11.1 - Transformações de sulfato para sulfeto ocorrem em ambiente anaeróbico e de sulfeto para sulfato em aerobiose.

Todos os processos relacionados à transformação do enxofre na natureza, acima descritos, apresentam variações no estado de oxidação-redução desse elemento. Essa variação é resultado da ocorrência das reações de oxidação-redução, que são vitais para a manutenção do sistema (SCHERER, 2001; TOSTEVIN et al., 2014).

De maneira mais didática, os processos componentes do ciclo do enxofre podem ser divididos em processos de redução, oxidação e mineralização/imobilização do enxofre nos solos, a seguir apresentados de forma mais detalhada.

11.3.1. Processos de redução do enxofre nos solos

Toda vez que um elemento ou uma molécula ganha elétrons, sofre uma reação de redução. Este tipo de processo usa as formas de enxofre em solos durante o processo de imobilização deste elemento ou sob

condições de baixo potencial redox, o que comumente está relacionado à anaerobiose neste ambiente. Este processo é encontrado em três formas no solo, chamados de: i) Redução Assimilativa, ii) Respiração do Enxofre ou iii) Redução Dissimilativa (Tabela 11.1).

A Redução Assimilativa é um processo anabólico que algumas plantas e microrganismos possuem para incorporar $S-SO_4^{2-}$ e convertê-lo em aminoácido ou outra molécula biológica, que usa como fonte a molécula S^{2-} . De modo geral, o SO_4^{2-} é transportado para o citoplasma e fosforilado, originando a adenosina-5-fosfosulfato (APS) e o pirofosfato (PPi). Todas essas etapas utilizam enzimas e consomem ATP. A APS pode ser reduzida a S^{2-} por duas vias, dependendo das características do organismo; uma via de redução direta de APS ou uma via de fosforilação que forma a fosfoadenosina fosfossulfato (PAPS) (MEYER; KUEVER, 2007a, 2007b).

A Respiração do Enxofre ocorre em bactérias que se multiplicam utilizando compostos de carbono simples como acetato, etanol e propanol em combinação com o enxofre elementar (S^0), usado neste caso como aceptor final de elétrons. Basicamente, neste processo, a matéria orgânica é oxidada e os elétrons são transferidos para o S^0 , originando S^{2-} . Dessa forma este processo de redução do S é estritamente realizado em condições anaeróbias (BURNS; DICHRISTINA, 2009).

Os principais gêneros envolvidos na respiração do enxofre estão exemplificados na tabela 11.1. A Redução Dissimilativa do Sulfato acontece quando os microrganismos utilizam o SO_4^{2-} como aceptor final de elétrons para a degradação de compostos orgânicos, resultando na produção de S^{2-} . Estes organismos são anaeróbios, e se encontram amplamente distribuídos na natureza, conhecidos como microrganismos redutores do sulfato (MRS), os quais podem também utilizar H_2 como um doador de elétrons para permitir a redução do SO_4^{2-} (CARDOSO et al., 1992; RABUS, HANSEN; WIDDEL; 2006).

A redução de SO_4^{2-} inicia-se com a sua entrada na célula. O transporte do SO_4^{2-} transmembrana ocorre a partir de um gradiente iônico (tal como H^+/Na^+ sem gasto energético). O SO_4^{2-} citoplasmático é fosforilado (ATP sulfirilase), resultando na formação de adenosina-APS (APS-adenilissulfatase) e pirofosfato (PPi). O adenosina fosfossulfato (APS) formado é imediatamente convertido a sulfito e AMP antes da transferência de elétrons ao sulfito (SO_3^{2-}) para a formação de S^{2-} (MUYZER; STAMS, 2008).

As reduções de SO_4^{2-} que ocorrem no ambiente são resultantes de um consórcio anaeróbico de bactérias e arqueias, que incluem fermentadoras, redutoras de sulfato e metanogênicas, as quais atuam em conjunto para mineralizar os compostos orgânicos para dióxido de carbono e metano. No final da redução do sulfato se obtém sulfeto de hidrogênio, o qual pode ser metabolizado por quimioautotróficos ou fotoautotróficos e ser reoxidado, sendo possível sua volatilização para a atmosfera (MUSSMANN et al., 2005; PEREIRA et al., 2011).

11.3.2. Processos de oxidação do enxofre nos solos

Sempre que uma molécula perde elétrons, este fenômeno é chamado de oxidação. Na presença do oxigênio, compostos reduzidos de enxofre (S^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, S^0 , etc.) podem ser oxidados por bactérias quimioautotróficas ou quimiolitotróficas, enquanto que este processo é exclusivamente realizado por bactérias fototróficas em condições anaeróbicas (GERMIDA; JANZEN, 1993).

Os quimioautotróficos podem oxidar sulfeto de hidrogênio (H_2S) para enxofre elementar (S^0), o qual é depositado dentro da célula como grânulos. A energia produzida por esta oxidação é utilizada para fixar CO_2 para o crescimento celular por bactérias que fazem fotossíntese (MUYZER; STAMS, 2008). (Tabela 4).

A oxidação fotoautotrófica do enxofre é limitada a bactérias verdes e púrpuras, realizando a denominada fotossíntese anoxigênica. Este grupo fixa carbono usando energia da luz e oxidando H_2S para S^0 (SCHERER, 2009). Em seu metabolismo, o H_2S serve como doador de elétrons para a realização do processo fotossintético. Essas bactérias precisam desse poder redutor para fixar CO_2 . Nesse processo forma-se S^0 , o qual é depositado intracelularmente (bactérias púrpuras) ou extracelularmente (bactérias verdes). Na ausência de H_2S , o enxofre pode ser oxidado até SO_4^{2-} (MUYZER; STAMS, 2008). O S^0 pode ser usado como fertilizante após ser oxidado a SO_4^{2-} . Diversos grupos microbianos são reportados por terem a capacidade de realizar esta oxidação, no entanto, pouco se conhece sobre eles nos solos brasileiros. Assim, pesquisas nestas áreas têm permitido aumentar o conhecimento sobre estes grupos específicos. Lucheta (2010) determinou, em três solos brasileiros, a taxa de oxidação de S^0 , a diversidade de bactérias e arqueias envolvidas no processo, e isolou bactérias oxidantes com o fim de determinar seu potencial como biofertilizante. Este autor encontrou que a oxidação de S^0 varia de acordo com o tipo de solo sendo maior a oxidação em solos arenosos que nos argilosos, além de mostrar que a

oxidação de S^0 eleva a quantidade de sulfato e reduz o pH, principalmente nos solos arenosos. Alguns isolados bacterianos afiliados a *Acinetobacter*, *Mycobacterium* e *Acidithiobacillus thiooxidans* foram testados para avaliar a capacidade de transformação do S^0 para SO_4^{2-} , confirmando-se que *A. thiooxidans* é a espécie mais eficiente, com capacidade de aumentar a oxidação de S^0 para SO_4^{2-} . Isto demonstra o potencial dos microrganismos para aplicação na agricultura.

Tabela 11.1 - Transformações biológicas do enxofre no solo e a diversidade microbiana descrita como promotora das transformações

| Grupo | Reação | Requerimentos do ambiente | Gêneros |
|---|---|--|---|
| Quimioautotróficas obrigatórias ou facultativas | $H_2S \rightarrow S^0$ $S^0 \rightarrow SO_4^{2-}$ $S_2O_3^{2-} \rightarrow SO_4^{2-}$ | H_2S , O_2 Interface de O_2 | <i>Acidithiobacillus</i> <i>Achromatium</i> <i>Beggiatoa</i> , <i>Sulfobacillus</i> <i>Thiomicrospira</i> , <i>Thermothrix</i> |
| Fototróficos anaeróbios que utilizam S reduzido como doadores de elétrons | $H_2S \rightarrow S^0$ $S^0 \rightarrow SO_4^{2-}$ | Anaeróbico, H_2S , luz | <i>Chlorobium</i> , <i>Chromatium</i> <i>Ectothiorhodospira</i> , <i>Rhodopseudomonas</i> <i>Thiopedia</i> |
| Heterotróficos que usam S oxidado como acceptor final de elétrons | $SO_4^{2-} \rightarrow HS^-$ $S_2O_3^{2-} \rightarrow HS^-$ $S^0 \rightarrow HS^-$ $SO_3^- \rightarrow HS^-$ | Anaeróbico; substrato orgânico disponível, não requer luz. | <i>Campylobacter</i> <i>Desulfomonas</i> <i>Desulfovibrio</i> <i>Desulfomatoculum</i> <i>Desulfomonas</i> |
| Autotróficos que usam S reduzido como fonte de energia. | $HS^- \rightarrow S^0$ $S^0 \rightarrow SO_4^{2-}$ $S_2O_3^{2-} \rightarrow SO_4^{2-}$ | Interface H_2S-O_2 e alta temperatura. Atuam na biolixiviação | <i>Achromatium</i> <i>Beggiatoa</i> <i>Thiobacillus</i> <i>Thiomicrospira</i> |
| Heterotróficos que usam S-orgânico (energia). | $S\text{-org} \rightarrow HS^-$ $S\text{-org} \rightarrow S\text{-volátil}$ Éster $SO_4 \rightarrow SO_4^{2-}$ | Presença de S-orgânico. Presentes em solos e sedimentos. | Diversos microrganismos (mineralização) |
| Microrganismos que utilizam SO_4^{2-} ou H_2S na biossíntese | $SO_4^{2-} \rightarrow \text{proteína}$ $HS^- \rightarrow \text{proteína}$ $SO_4^{2-} \rightarrow \text{DMSP}$ | Ocorre em solos e sedimentos | Maioria dos microrganismos. |

11.3.3. Processos de mineralização/imobilização do enxofre nos solos

A Imobilização é também chamada de redução assimilatória do SO_4^{2-} (estudada no item anterior). Nesta etapa o S é assimilado dentro dos compostos orgânicos, obtidos a partir de SO_4^{2-} por plantas e microrganismos, em um processo comum a todos eles, no qual ocorrem as reações enzimáticas que levam à conversão de SO_4^{2-} em cisteína. (LIU; BEER; WHITMAN, 2012; MUYZER; STAMS, 2008).

Na mineralização, a liberação de S das formas orgânicas acontece tanto em condições aeróbicas como anaeróbicas. Algumas enzimas atuam sobre a cisteína especificamente para remoção de formas de S-org. Para tanto, a enzima serina sulfidrilase pode remover H_2S e a enzima cisteína sulfidrilase pode remover sulfito e amônio a partir da cisteína.

A maioria do S-org encontra-se nos aminoácidos e nos ésteres de sulfato. A mineralização de S é influenciada por diferentes fatores que afetam a multiplicação e a atividade microbiana no solo, especialmente: o suprimento de energia e nutrientes, a relação C/S e a abundância de S nos resíduos orgânicos, umidade, pH, temperatura e potencial redox do solo (ERIKSEN et al., 1998; HAVLIN et al., 2005; SCHOENAU; MALHI, 2008).

Em solos com boa areação, S-org é mineralizado para a forma de SO_4^{2-} . Materiais orgânicos com relação C/S < 200 podem gerar um ganho líquido de SO_4^{2-} para o solo. Em contrapartida, se essa relação for maior que 400 pode ocorrer imobilização de S na biomassa microbiana. (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001; HAVLIN et al., 2005; KERTESZ et al., 2007).

11.4. Considerações finais

O enxofre é um elemento essencial para o crescimento e desenvolvimento dos organismos vivos, já que é indispensável para a síntese de vitaminas, aminoácidos, hormônios e coenzimas. Possui reservatórios tanto na atmosfera, como no oceano e na terra. Este elemento pode ser encontrado nas formas orgânica e inorgânica. Normalmente a maior parte do S nos ecossistemas encontra-se na forma orgânica. O íon SO_4^{2-} na solução do solo é a forma absorvida pelas plantas, mas a disponibilidade depende dos processos de adsorção/dessorção e mineralização/imobilização. Os principais reservatórios de S encontram-se nas rochas sedimentares e na água do mar.

As principais reações no ciclo do enxofre podem ser divididas em 4 processos básicos: 1) mineralização do S (conversão de formas orgânicas de S a SO_4^{2-}); 2) imobilização ou assimilação de SO_4^{2-} (conversão de SO_4^{2-} a formas orgânicas de S); 3) redução dissimilatória de SO_4^{2-} e 4) oxidação de H_2S .

Conhecer o ciclo do S é de grande importância devido aos seus fortes impactos globais, incluindo a formação de chuva ácida, drenagem de minas ácidas e corrosão de concreto e metal.

11.5. Estudo de caso

Solos alagados, muitas vezes para cultivo de arroz, podem gerar uma série de transformações químicas, físicas e biológicas no sistema, relacionadas com a ciclagem do S. De modo geral, a difusão limitada de O_2 gera um ambiente reduzido, sendo que a respiração anaeróbia é favorecida através do uso de outros aceptores finais de elétrons como o SO_4^{2-} . Esse fenômeno ocorre em solos com potenciais redox (Eh) negativos, conforme discutido no capítulo 5. No entanto, a redução do S não é o único processo que ocorre em solos alagados. Há também a absorção de SO_4^{2-} pelas plantas, a imobilização pela matéria orgânica, a adsorção nos sítios de troca e a remoção por lixiviação. Neste caso, como se projeta um sistema de manejo eficiente para não ocorrer excesso de perdas de enxofre por drenagem nestas áreas? Quais variáveis ambientais podem ser quantificadas e monitoradas de forma a maximizar o desenvolvimento vegetal em solos sob esta condição?

Referências

BURNS, J.L.; DICHRISTINA, T.J. Anaerobic respiration of elemental sulfur and thiosulfate by *Shewanella oneidensis* MR-1 requires *psrA*, a homolog of the *phsA* gene of *Salmonella enterica* serovar typhimurium LT2. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 16, p. 5209-5217, 2009.

DE KOK, L.J. et al. Pathways of plant sulfur uptake and metabolism - an overview. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, New York, v. 283, p. 5-13, 2005.

CARDOSO, E.J.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. 360 p.

ERIKSEN, J. Soil sulfur cycling in temperate agricultural systems. In: JEZ. J. **Sulfur: a missing link between soils, crops and nutrition**. Madison: American Society of Agronomy, 2008.

ERIKSEN, J.; MURPHY, M.D.; SCHNUG, E. The soil sulfur cycle. In: SCHNUG, E. (Ed.). **Sulphur in agroecosystems**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1998. p. 39-74.

FRENEY, J.R. Oxidation of sulfur in soils. **Mineralium Deposita**, Berlin, v. 2, p. 181-187, 1967.

GERMIDA, J.J.; JANZEN, H.H. Factors affecting the oxidation of elemental sulfur in soils. **Fertilizer Research**, Hague, v. 35, p. 101-114, 1993.

HAVLIN, J.L. et al. **Soil fertility and fertilizers: an introduction to nutrient management**. 7th ed. New Jersey: Pearson Prentice Hall, 2005. chap. 7.

HOLGUIN, G.; VAZQUEZ, P.; BASHAN, Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 33, n. 4, p. 265-278, 2001.

KERTESZ, M.A.; FELLOWS, E.; SCHMALENBERGER, A. Rhizobacteria and plant sulfur supply. **Advances in Applied Microbiology**, New York, v. 62, p. 235-268, 2007

LIU, Y.; BEER, L.L.; WHITMAN, W.B. Sulfur metabolism in archaea reveals novel processes. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 14, n. 10, p. 2632-2644, 2012.

LUCHETA, AR. **Oxidação microbiológica do enxofre elementar no solo**. 2010. 96 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

MEYER, B.; KUEVER, J. Molecular analysis of the diversity of sulfate-reducing and sulfur-oxidizing prokaryotes in the environment, using *aprA* as functional marker gene. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 23, p. 7664-7679, 2007a.

_____. Phylogeny of the alpha and beta subunits of the dissimilatory adenosine-5'-phosphosulfate (APS) reductase from sulfate-reducing prokaryotes: origin and evolution of the dissimilatory sulfate-reduction pathway. **Microbiology**, London, v. 153, n. 7, p. 2026-2044, 2007b.

- MUSSMANN, M. et al. Clustered genes related to sulfate respiration in uncultured prokaryotes support the theory of their concomitant horizontal transfer. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.187 n.20, p. 7126–7137, 2005.
- MUYZER, G.; STAMS, A.J. The ecology and biotechnology of sulfate-reducing bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 6, p. 441-454, 2008.
- PEREIRA, I.A.C. et al. A comparative genomic analysis of energy metabolism in sulfate reducing bacteria and archaea. **Frontiers in Microbiology**, Amsterdam, v. 2, p. 1-22, 2011.
- RABUS, R.; HANSEN, T.A.; WIDDEL, F. An excellent overview of the physiology, biochemistry and molecular biology of sulfate- and sulfur-reducing prokaryotes. In: **The prokaryotes**. DWORKIN, M.; SCHLEIFER, K.-H.; STACKEBRANDT, E. (Ed.). New York: Springer, 2006. p. 659–676.
- SCHERER, H.W. Sulphur in crop production: invited paper. **European Journal of Agronomy**, Amsterdam, v. 14, p. 81–111, 2001.
- _____. Sulfur. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, New York, v. 172, p. 326–335, 2009.
- SCHOENAU, J.J.; MALHI, S.S. Sulfur forms and cycling processes in soil and their relationship to sulfur fertility. In: JEZ. J. (Ed.). **Sulfur: a missing link between soils, crops and nutrition**. Madison: American Society of Agronomy, 2008. p. 1-10.
- SUZUKI, I. Oxidation of inorganic sulfur compounds: chemical and enzymatic reactions. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 45, p. 97-105, 1999.
- TABATABAI, M.A. Importance of sulfur in crop production. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 1, p. 45-62, 1984.
- TOSTEVIN, R. et al. Multiple sulfur isotope constraints on the modern sulfur cycle. **Earth and Planetary Science Letters**, Amsterdam, v. 396, p. 14–21, 2014.

CAPÍTULO 12

MICORRIZAS

*Rafael Borges da Silva Valadares, Denise LC Mescolotti,
Elke JBN Cardoso*

12.1. Introdução

O termo micorriza é derivado do grego, significando “fungos-raízes”, e foi introduzido em 1885 por Albert Bernard Frank (FRANK, 2005) para descrever a interação simbiótica mutualista entre plantas e fungos do solo.

Nela ocorre, primariamente, o fluxo de carbono (C) orgânico da planta hospedeira para o fungo micorrízico e de elementos inorgânicos do fungo para a planta (ALLEN, 1991). Por funcionarem como uma extensão das raízes, as associações micorrízicas aumentam a área de exploração radicular, sendo cruciais para a absorção eficiente de nutrientes e água pelas plantas terrestres. Possuem também funções relacionadas à estruturação do solo, aumento da tolerância a estresses abióticos e resistência a doenças em plantas. São, portanto, cruciais para a manutenção de ecossistemas terrestres, naturais ou agrícolas, tendo seu efeito mais pronunciado em ambientes mais empobrecidos. Em ecossistemas tropicais, onde predominam solos muito intemperizados e oxidados, as associações micorrízicas são cruciais para o aumento da absorção de fósforo (P), principalmente devido à baixa mobilidade deste elemento e seu caráter limitante para a produção agrícola e florestal.

Tradicionalmente, duas classes de micorrizas são reconhecidas, as ectomicorrizas e as endomicorrizas. As ectomicorrizas possuem suas estruturas formadas nos espaços intra-celulares enquanto que as endomicorrizas formam estruturas no interior das células vegetais. Entretanto, com o aumento do número de observações, pesquisadores notaram que esta classificação era insuficiente para categorizar adequadamente a diversidade de micorrizas existentes. Assim, Harley e Smith (1983) reconheceram sete tipos de micorrizas que, para a maioria dos autores, é a classificação mais aceita atualmente; são eles: 1) micorrizas arbusculares; 2) ectomicorrizas; 3) ectendomicorrizas, 4) micorrizas arbutóides, 5) micorrizas monotrópides, 6) micorrizas ericóides e 7) micorrizas de orquídeas.

As micorrizas arbusculares e as ectomicorrizas são as mais abundantes e bem distribuídas ao redor do globo (SMITH; READ, 1997; ALLEN et al., 2003). Os fungos micorrízicos arbusculares são pertencentes ao filo Glomeromycota e as micorrizas arbusculares são encontradas em aproximadamente 85% de todas as famílias de Angiospermas (Smith e Read 2010). Já as ectomicorrizas, apesar de serem também bem distribuídas, se associam a apenas 3% das famílias das plantas vasculares. Os fungos capazes de estabelecer este tipo de interação são pertencentes aos filos Ascomycota e Basidiomycota (SIDDIQUI et al., 2008).

A seguir, são apresentadas informações sobre os três tipos de associação micorrízica mais estudados no Brasil, suas características anatômicas, diversidade de organismos envolvidos, dinâmica de nutrientes e mecanismos regulatórios da interação, com destaque para suas funções nos ecossistemas agrícolas ou em ambientes naturais (SIQUEIRA et al., 2010).

12.2. Micorrizas Arbusculares (MAs)

12.2.1 Visão Geral

As micorrizas arbusculares são formadas em uma enorme variedade de plantas hospedeiras, que interagem com fungos mutualistas obrigatórios (biotróficos), classificados no filo Glomeromycota (SCHÜBLER et al., 2001). Dentre as plantas que produzem micorrizas arbusculares, além da maioria das angiospermas, estão gimnospermas e esporófitos de pteridófitas, que possuem raízes, assim como gametófitos de plantas hepáticas (briófitas) e de pteridófitas, que não possuem raízes (READ et al., 2000). Assim, a capacidade de realizar a interação micorrízica na natureza é regra e não exceção. É bem provável que os fungos tiveram sua origem há mais de 1 bilhão de anos e que as micorrizas arbusculares sejam também extremamente antigas. Como comentado anteriormente, devido às suas funções na absorção de nutrientes, a associação com fungos micorrízicos arbusculares (FMA) foi uma adaptação evolutiva importante que permitiu a colonização dos ambientes terrestres pelas plantas (SIMON et al., 1993; REMY et al., 1994; TAYLOR et al., 1995; REDECKER et al., 2000; HECKMAN et al., 2001).

A associação micorrízica arbuscular inicia-se quando um esporo ou uma hifa de fungo do solo responde à presença de um estímulo radicular, crescendo em direção à raiz, estabelecendo contato e crescendo ao longo de sua superfície. As hifas produzem apressórios na superfície de

células da epiderme e penetram nessas células e no córtex radicular. Estas hifas cruzam a hipoderme e começam a se ramificar no córtex, onde se estabelece a simbiose funcional.

Uma micorriza arbuscular é composta basicamente por três componentes: raízes, estruturas fúngicas (dentro e entre as células das raízes) e micélio extra-radicular. Dentre as estruturas fúngicas que caracterizam as micorrizas arbusculares, devemos destacar:

Arbúsculos: Estruturas formadas internamente à célula vegetal, mas separadas por uma interface fungo-planta denominada membrana perifúngica. Os arbúsculos são a estrutura mais característica das MA, possuem anatomia que recorda um arbusto e, portanto, podem ser facilmente reconhecidos com auxílio de técnicas de microscopia adequadas (Figura 12.1). Os arbúsculos começam a se formar aproximadamente dois dias após a infecção. São considerados o principal sítio de troca de nutrientes entre fungos e planta, isto baseado na alta superfície de troca na interface do arbúsculo. Possuem meia-vida curta e começam a colapsar após poucos dias, mas hifas e vesículas podem permanecer nas raízes por meses ou até anos.

Esporos: Estruturas propagativas em estado de quiescência, ou seja, precisam ser ativados para desencadear suas funções metabólicas de germinação e crescimento. Os FMA são considerados biotróficos obrigatórios e, portanto, só se propagam quando associados a uma planta viva. Os esporos contêm lipídios como reserva para a germinação, citoplasma e vários núcleos. Normalmente desenvolvem paredes espessas com mais de uma camada. Podem também se aglomerar, formando esporocarpos. Funcionam, portanto, como compartimentos de reserva e propágulos.

Vesículas: Estruturas que se desenvolvem para o acúmulo de reservas em parte das associações micorrízicas arbusculares. Começam a se desenvolver logo após os arbúsculos, mas continuam seu desenvolvimento após a senescência destes. Podem ser intra- ou intercelulares. Podem desenvolver paredes espessas em raízes mais antigas e também funcionar como propágulos (BIERMANN; LINDERMAN 1983). Alguns fungos produzem vesículas similares à estrutura dos esporos produzidos no solo, mas na maioria dos casos são diferentes.

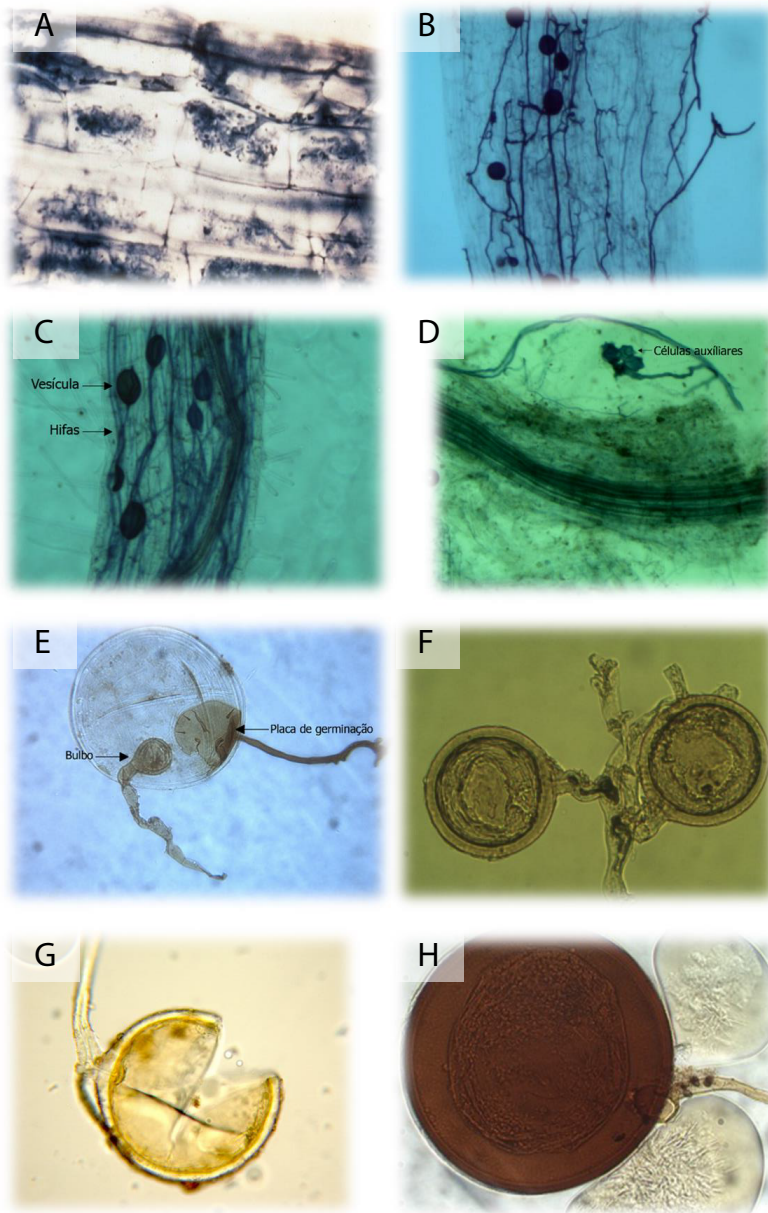


Figura 12.1 - Estruturas que caracterizam as micorrizas arbusculares. A) arbúsculos; B) raiz de planta da caatinga colonizada por FMA; C) vesículas e hifas; D) células auxiliares; E) esporo de *Dentiscutata cerradensis*; F) esporo presente em solo de cultivo de café; G) esporo de *Rhizophagus clarus*; H) esporo de *Dentiscutata heterogama*.

A taxonomia atual dos fungos que formam micorrizas arbusculares divide as espécies em quatro ordens: Glomerales, Diversisporales, Archaeosporales, Paraglomerales. Estas ordens estão atualmente subdivididas em 11 famílias e 18 gêneros. Os padrões de desenvolvimento dos esporos, atributos moleculares, presença de vesículas e a organização destas estruturas subcelulares são a base para a taxonomia de Glomeromycota. Para maiores informações a respeito da taxonomia atual dos FMA, consultar Redecker et al. (2013).

As micorrizas arbusculares estão presentes em quase todas as famílias de plantas cultivadas na Agricultura, principalmente entre as Angiospermas. Apenas umas poucas famílias vegetais, como, por exemplo, as Crucíferas, não formam micorrizas. Entre as Gimnospermas, entretanto, o mais comum é a presença de ectomicorrizas. Uma exceção é constituída pelo Pinheiro do Paraná, a *Araucaria angustifolia*, que apresenta a micorriza arbuscular (BONFIM et al., 2015)

12.2.2 Importância agrícola e ambiental

O efeito dos fungos micorrízicos sobre o crescimento das plantas é especialmente significativo com relação aos nutrientes de baixa mobilidade no solo, que se movem preferencialmente por difusão, processo extremamente lento. Dentre estes nutrientes, destacamos o macronutriente fósforo (P) e os micronutrientes como zinco (Zn) e cobre (Cu).

Já o nitrogênio (N), por ser um elemento mais móvel (na forma de nitrato), move-se no solo preferencialmente por fluxo de massa, sendo, portanto, também absorvido pelas hifas micorrízicas. Contudo, este efeito é menos perceptível. Porém, quando se encontra na forma de amônio, um íon menos móvel, é comum observar-se o aumento de sua absorção em plantas micorrizadas (GEORGE et al., 1992) (Figura 12.2).

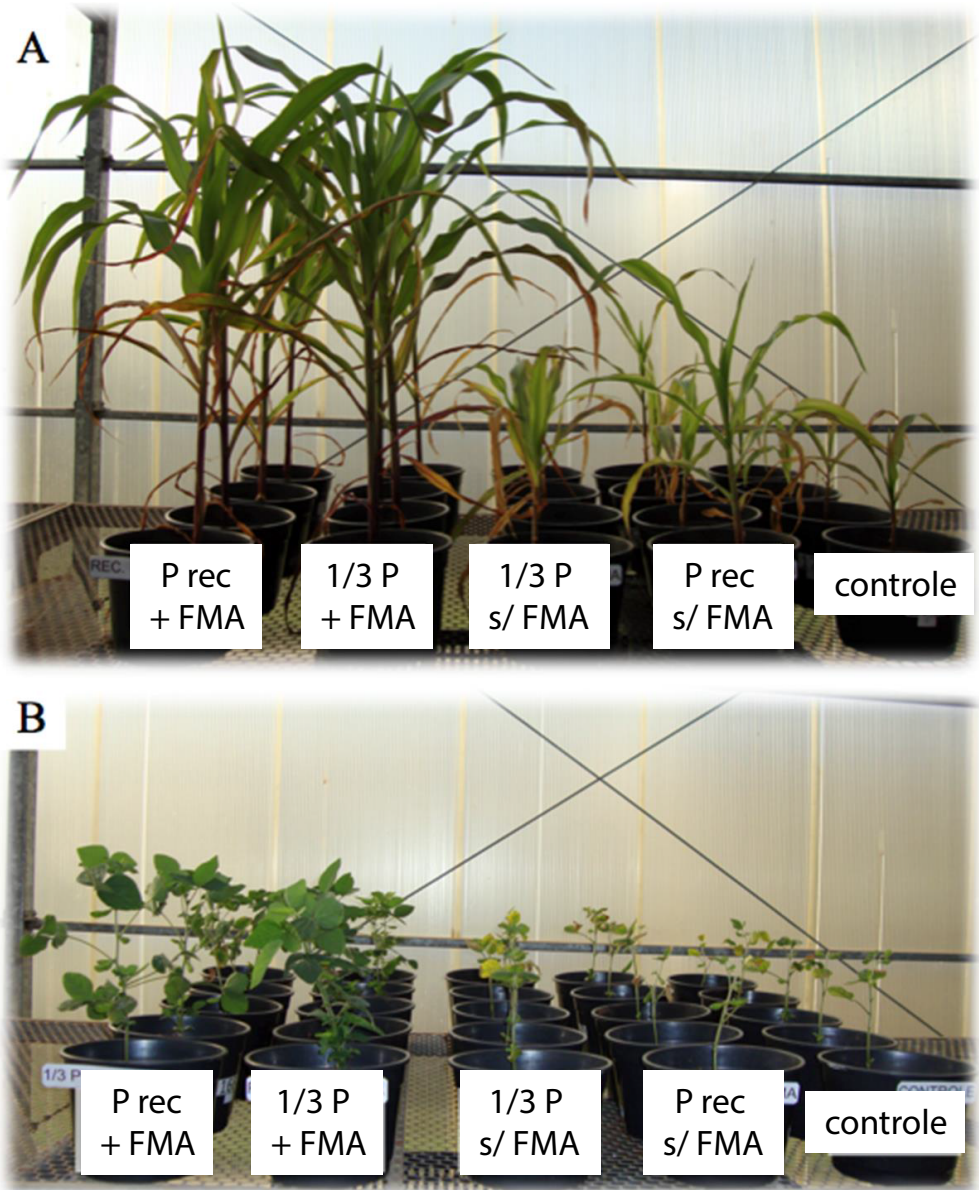


Figura 12.2 - Desenvolvimento de plantas de milho (A) e soja (B) frente à adição de adubação fosfatada e fungos micorrízicos arbusculares. Nessa figura temos os seguintes tratamentos: P rec = dose recomendada; 1/3 P = 1/3 da dose. +FMA = com micorriza e s FMA = sem micorriza. Controle = sem P e sem micorriza. (Fotos: Luis Fernando Baldesin)

Em ecossistemas tropicais a limitação por P é comum devido ao alto grau de intemperização em que se encontram os solos, o que os torna ácidos e oxidados, características que levam a uma alta taxa de fixação irreversível do P na fase sólida, tornando-o indisponível para as plantas (NOVAIS; SMITH 1999). Esta constante limitação por P é contornada por altas aplicações de fosfato solúvel ou rochas fosfáticas. Visto que este é um procedimento caro e que o P é um recurso natural não renovável, é importante a otimização de tecnologias alternativas que permitam uma produção vegetal adequada, sem a necessidade de aplicação de altas doses de fertilizantes (CARDOSO et al., 2010). Esta prática, além de acarretar um possível mau uso dos recursos financeiros, também promove a rápida mineralização da matéria orgânica do solo, o que altera drasticamente a dinâmica físico-química e, sobretudo, microbiológica do ambiente de cultivo.

Na rizosfera vivem muitos fungos e bactérias solubilizadores de fosfato, porém os íons fosfato só são absorvidos quando se localizam na região de contato imediato com a raiz. Assim, as hifas extracelulares dos FMA vão muito além desta zona, explorando grande volume de solo e microssítios inacessíveis às raízes. A colonização micorrízica arbuscular também pode proteger as plantas contra patógenos e excesso de metais pesados (NOGUEIRA; CARDOSO, 2003), além de melhorar a eficiência no uso da água e a estabilidade de agregados do solo, em função do grande volume de micélio externo (CARDOSO et al., 2010).

12.2.3 Regulação das MAs

Brundrett (2004) conceitua micorrizas como "interações simbióticas entre fungos e raízes de uma planta viva, que são, a princípio, responsáveis por transferências de nutrientes entre os simbiosites. Micorrizas formam estruturas especializadas onde um contato íntimo entre os simbiosites resulta de um desenvolvimento sincronizado entre planta e fungo". Na verdade, micorriza é o nome que se dá ao conjunto de estruturas fúngicas e vegetais em simbiose. Quando os autores se referem a um "desenvolvimento sincronizado", eles explicitam a necessidade de uma grande afinidade entre os parceiros. Mecanismos de atração, reconhecimento, colonização e regulação da simbiose são resultantes de um intenso diálogo molecular que modula todas as etapas da interação (BONFANTE; GENRE, 2010).

Atualmente, é sabido que as plantas produzem uma classe de hormônios chamados estrigolactonas que, nas plantas, atuam inibindo a ramificação aérea, mas que estimulam a germinação e ramificação de hifas fúngicas. Do lado do fungo, oligômeros de quitina foram recentemente descritos como moléculas que ativam respostas relacionadas à simbiose micorrízica em *Medicago truncatula*, sendo que a produção destas moléculas é estimulada pelo contato com a estrigolactona (GENRE et al., 2013). Esta relação em muito se assemelha à produção de “fatores *nod*” em resposta a flavonóides secretados por raízes de leguminosas. De fato, grande parte das respostas moleculares demonstradas em interações micorrízicas se sobrepõem àquelas encontradas na associação rizóbio-leguminosa. Por exemplo, em *Medicago truncatula*, estas interações compartilham uma série de genes (aos menos 7) que são denominados de “*the common SYM pathway*”, ou seja, uma via de transdução de sinais comum entre as simbioses.

Do ponto de vista nutricional, é importante destacar que a elevada fertilidade do solo inibe a associação, sendo amplamente conhecido que altos níveis de P no solo diminuem drasticamente as taxas de colonização micorrízica, enquanto adições moderadas de P podem até mesmo favorecer o estabelecimento do fungo e seu efeito sobre a nutrição e desenvolvimento vegetal (CARDOSO et al., 2010). A atividade de enzimas de defesa, com efeitos antifúngicos em plantas tende a diminuir as taxas de colonização e esse efeito é modulado pelo teor de P disponível (LAMBALIS; MEHDY, 1993). Assim, em baixas concentrações de P ocorrem altas taxas de colonização micorrízica, enquanto que em ambientes com alta disponibilidade de P a micorrização é inibida. A explicação natural para este fenômeno é que uma planta, em ambiente com alta disponibilidade de P não necessita “investir” na associação, uma vez que possui nutrientes suficientes para o seu desenvolvimento. O termo investir neste caso deve ser entendido como a necessidade de direcionar recursos energéticos, ou seja, fotoassimilados, para o fungo micorrízico, que é fonte de nutrientes, mas dreno de açúcares oriundos da fotossíntese.

12.3 Ectomicorrizas

12.3.1 Visão geral

Em regiões de clima temperado, as ectomicorrizas podem ser encontradas em aproximadamente 90% das espécies florestais, enquanto que, nas regiões tropicais, a maioria das espécies forma micorrizas arbusculares (MEYER, 1973; KASUYA et al., 2010). Entretanto, no Brasil, existe um grande interesse na utilização de fungos ectomicorrízicos na produção de espécies exóticas, amplamente empregadas em programas de reflorestamento, como *Pinus*, *Eucalyptus* e *Acacia*. A ocorrência de ectomicorrizas também já foi observada em espécies arbóreas nativas do cerrado, como *Balbinia holophila* (Caesalpinoidea), e *Campomanesia coerulea* (Myrtaceae) (THOMAZINI, 1974 citado por KASUYA et al., 2010).

Estima-se que mais de 5.000 espécies de fungos sejam capazes de formar ectomicorrizas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002). Ao contrário das micorrizas arbusculares, são muitas espécies de fungos interagindo com poucas espécies de plantas. Muitos dos fungos ectomicorrízicos podem ser identificados no campo, através da observação de seus corpos de frutificação (basídios ou ascocarpos). No Brasil, os gêneros *Pisolithus*, *Scleroderma*, *Rhizopogon*, *Amanita*, *Lactarius*, *Russula*, *Thelephora* e *Ramaria*, todos eles Basidiomicetos, são os mais encontrados em cultivos de *Pinus* e Eucalipto. Fungos da divisão Ascomycota também podem formar ectomicorrizas e alguns são de valor econômico, como as famosas trufas europeias do gênero *Tuber*, que forma ectomicorrizas no carvalho.

A ectomicorriza se caracteriza pela presença de três componentes: (a) o manto fúngico, formado pelo tecido fúngico que recobre a raiz; (b) a ramificação intercelular nas células da epiderme e do córtex, denominada Rede de Hartig; e (c) estruturas externas ao sistema radicular, hifas e rizomorfos, essenciais para a conexão com o solo e formação dos corpos de frutificação (Figura 12.2) (SIQUEIRA et al., 2010).

Em geral, o manto fúngico apresenta apenas uma camada de hifas, mas, às vezes forma um falso tecido parenquimático, com duas ou mais camadas. A organização do manto é importante para a absorção de água, nutrientes e modera a suscetibilidade da planta a patógenos do solo (PETERSON; BONFANTE, 1994). As hifas do manto funcionam como uma barreira física contra a penetração de patógenos e também são capazes de sintetizar compostos de reserva como glicogênio, polifosfatos e proteínas. As variações na estrutura do manto, as ornamentações da

superfície, a coloração e a presença de rizomorfos, juntamente com testes químicos e imunológicos, são utilizados para a caracterização das ectomicorizas e identificação do fungo associado (SMITH; READ, 2010, KASUYA et al, 2010). Entretanto, os corpos de frutificação também são essenciais para a taxonomia morfológica dos fungos ectomicorrízicos.

A rede de Hartig, por sua vez, é o sítio onde acontecem as trocas de nutrientes entre planta e fungo. É constituída de ramificações das hifas entre as células da epiderme e do córtex da raiz, aumentando a interface de contato entre os simbioss. Em geral a rede de Hartig encontra-se limitada aos espaços intercelulares da epiderme nas angiospermas. Já nas gimnospermas a rede de Hartig pode penetrar por várias camadas do córtex, mas nunca ultrapassa o limite da endoderme radicular. O fato de a rede de Hartig se formar nos espaços intercelulares é outra diferença importante em relação às micorizas arbusculares, já que os arbúsculos, apesar de penetrarem diretamente o citoplasma, são formados dentro das células do hospedeiro.

As hifas e os rizomorfos formados externamente às raízes são, por sua vez, estruturas ligadas à absorção de água e de nutrientes (KASUYA et al., 2010). A formação de ectomicorizas inibe a formação de pelos radiculares, os quais são substituídos pelas hifas dos fungos. Esta regulação da morfogênese celular envolve ainda a secreção de compostos indólicos pelo fungo, tais como o ácido indolacético (AIA) e a hipaforina.

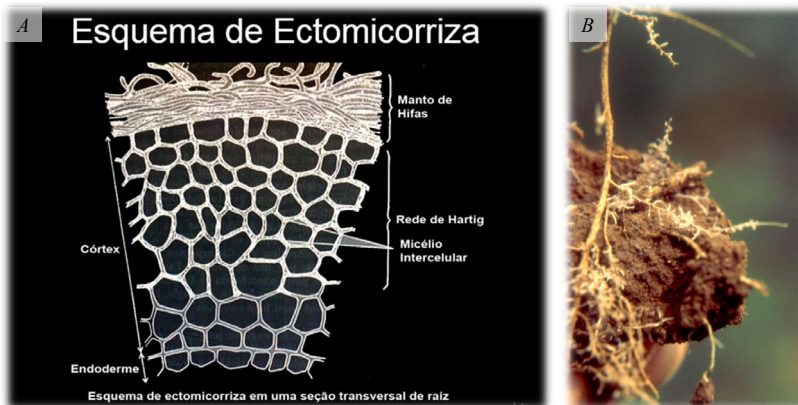


Figura 12.3 - Estruturas que caracterizam as ectomicorizas. A) Esquema representativo das estruturas típicas desta interação; B) foto de raiz com a presença de ectomicorizas. Apresentam-se como raízes altamente ramificadas com raízes secundárias encurtadas e engrossadas, cobertas com micélio de fungo (neste caso, de coloração branca).

12.3.2 Importância agrícola e ambiental das ectomicorrizas

A alta disponibilidade de P, assim como nas micorrizas arbusculares, inibe a formação das ectomicorrizas (CASTELLANO; MOLINA, 1989), mas essa concentração inibitória varia de acordo com as espécies de fungo e planta envolvidas na associação.

A associação ectomicorrízica pode ser empregada principalmente na produção de mudas de espécies florestais de clima temperado, melhorando o crescimento e a sobrevivência destas ao transplântio (CASTELLANO, 1994). A inoculação com fungos ectomicorrízicos diminui a incidência de patógenos em *Pinus* e promove significativamente o crescimento de mudas de eucalipto (BURGESS et al., 1995). Aliás, o eucalipto é uma das raras espécies vegetais que podem formar tanto micorrizas arbusculares como ectomicorrizas e ambas parecem ser importantes para o desenvolvimento da planta em diferentes períodos de seu crescimento (BINI, 2012; PEREIRA, 2015). O funcionamento da associação ectomicorrízica depende diretamente da habilidade do fungo em translocar nutrientes orgânicos ou inorgânicos do solo para a planta hospedeira e a compatibilidade e eficiência da interação são fatores que devem ser previamente revisados antes da implantação de um projeto de inoculação.

Considerando que grande parte dos plantios comerciais de *Pinus* e *Eucalyptus* estão localizados em regiões sujeitas a fortes extremos ambientais, como o excesso de temperatura, alta radiação solar e baixa pluviosidade, a associação ectomicorrízica é entendida como uma estratégia adaptativa das plantas para tolerar essas condições. O fato de os fungos ectomicorrízicos serem cultiváveis em meio de cultura facilita o processo de isolamento do simbionte, produção e inoculação. Um sistema de inoculação de mudas otimizado pode ser barato, eficiente e atuar significativamente na diminuição de perdas em plantios florestais, principalmente as relacionadas ao transplântio, adaptação e sobrevivência de mudas.

12.4. Micorrizas arbutóides, monotropóides, ericóides e ectendomicorrizas

Estas classes de associações micorrízicas são menos estudadas no Brasil por estarem relacionadas a um menor grupo de espécies vegetais, algumas com distribuição restrita a regiões de clima temperado.

As micorrizas arbutóides são endomicorrizas que formam novelos de hifas (do inglês *hyphal coils*) em células da epiderme radicular. São encontradas nos gêneros *Arbutus*, *Arctostaphylos* e *Pyrola*. São descritas por Largent et al. (1980), Molina e Trappe (1982) e Massicotte et al. (2005). Em *Arbutus* e *Arctostaphylos*, vários basidiomicetos como *Hebeloma*, *Laccaria*, *Rhizopogon*, *Pisolithus* e *Telephora* formam micorrizas. Esses fungos são muito conhecidos por formarem ectomicorrizas em outros hospedeiros, o que sinaliza que é a planta quem regula o desenvolvimento das micorrizas.

Já as micorrizas monotropóides são também endomicorrizas associadas a alguns poucos gêneros de plantas da família Ericaceae (mas antes pertenciam à família Monotropaceae) com nutrição micoheterotrófica (planta obtém C orgânico do fungo). É caracterizada por uma extensa penetração intracelular nas células de epiderme. Informações adicionais em relação aos aspectos estruturais e à identificação de fungos que colonizam *Monotropa*, *Pterospora*, *Sarcodes*, etc. podem ser encontradas em Robertson e Robertson (1982), Castellano e Trappe (1985) e Bidartondo et al. (2000).

As micorrizas ericóides, por sua vez, são um tipo de endomicorriza, pois formam novelos de hifas dentro das células da epiderme de plantas da família Ericaceae e outras famílias relacionadas. No hemisfério sul, membros da família Epacridaceae são os hospedeiros mais comuns dos fungos ericóides. São consideradas cruciais para o sucesso desta família de plantas, que são comuns em habitats com alto déficit nutricional. Os fungos que formam micorrizas ericóides são, em sua maioria, Ascomicetos.

As Ectendomicorrizas são um tipo intermediário entre as endomicorrizas e as ectomicorrizas. Essas associações possuem muitas das características das ectomicorrizas, apresentando rede de Hartig grossa e alto grau de penetração intercelular, especialmente nas partes mais velhas da raiz. Ocorrem principalmente em membros das coníferas, tais como no gênero *Pinus* e com fungos da classe dos Ascomicetos.

12.5. Micorrizas de orquídeas

Dentre as endomicorrizas, merecem destaque as associações micorrízicas de orquídeas ou micorrizas orquidóides. Essa associação se caracteriza pela colonização de células do córtex das raízes das orquídeas por enovelados de hifas fúngicas, os *pelotons* (ANDERSEN; RASMUSSEN,

1996). Como todas as orquídeas possuem sementes diminutas, desprovidas de endosperma, quase toda a energia utilizada na germinação é provida pela associação com fungo micorrízico. Todas as orquídeas, portanto, passam por uma fase micoheterotrófica, passando a se tornar independentes do fungo (do ponto de vista energético) à medida em que começam a produzir clorofila.

A maioria dos fungos micorrízicos pertence ao antigo gênero *Rhizoctonia*, um grupo polifilético que inclui patógenos, endofíticos, saprófitas e fungos micorrízicos. Recentemente estes fungos foram realocados em *Ceratobasidium*, *Thanatephorus*, *Tulasnella* e *Sebacina*. É interessante ressaltar que algumas linhagens de *Rhizoctonia sensu lato* são patógenos para algumas plantas mas formam micorrizas com orquídeas. No caso das micorrizas, o fluxo de C é invertido e quem leva vantagem é a planta. Estudos recentes demonstram o retorno de quantidades mínimas de C-org da planta para o fungo, mas o caráter mutualista desta interação ainda se encontra em discussão. Mais informações a respeito das micorrizas de orquídeas podem ser encontradas em Valadares (2010).

12. 6. Considerações finais

Neste capítulo foram abordados os diferentes tipos de associações micorrízicas existentes na natureza, com especial enfoque na importância da micorrização para o desenvolvimento das plantas em ecossistemas tropicais. Os benefícios da micorrização, tanto ambientais quanto econômicos, devem ser considerados na implantação de qualquer sistema produtivo, seja agrícola ou florestal. Cada tipo de associação micorrízica possui importância muito bem determinada e algumas funções são comuns entre eles como, por exemplo, o aumento da eficiência na absorção de nutrientes. De maneira geral, um sistema agrícola equilibrado, baseado na conservação da matéria orgânica do solo e manutenção da microbiota nativa deve ser priorizado, em detrimento de sistemas produtivos baseados na alta aplicação de fertilizantes e defensivos químicos, tendo em vista a sustentabilidade econômica e ambiental do agroecossistema.

12.7. Estudo de caso

Com o objetivo de avaliar o efeito de substratos orgânicos comerciais e inoculação de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) no desenvolvimento de mudas de cafeeiro Tristão et al. (2006) realizaram um experimento, em casa de vegetação, em arranjo fatorial 9 x 4 utilizando diferentes substratos à base de fibra de coco, casca de pinus, solo com esterco e solo puro. Foram testados os inóculos de FMA *Glomus intraradices*, *Glomus etunicatum*, *Gigaspora margarita* e um tratamento controle sem inoculação de fungo micorrízico. Aos 200 dias após transplante foram avaliadas: altura, diâmetro do caule, número de folhas, matéria seca da parte aérea, matéria fresca da raiz, teor de fósforo na parte aérea, colonização radicular, comprimento do micélio externo, atividade da fosfatase ácida e teores de pigmentos fotossintetizantes nas folhas do cafeeiro. Os melhores efeitos da micorrização foram constatados nas plantas colonizadas por *G. margarita*, cultivadas no substrato contendo casca de pinus. Quais os possíveis motivos que deram origem a este resultado? Quais as principais limitações para uma utilização mais ampla dos FMAs em áreas de cultivo vegetal? Discuta sobre possibilidades para sobrepor estes obstáculos.

Referências

- ALLEN, M.F. **The ecology of mycorrhizae**. New York: Cambridge University Press 1991. 184 p.
- ALLEN, M.F. et al. Ecology of mycorrhizae: a conceptual framework for complex interactions among plants and fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 4, n. 1, p. 271-303, 2003.
- ANDERSEN, T.F.; RASMUSSEN, H.N. The mycorrhizal species of Rhizoctonia. In: SNEH, B. et al. (Ed.). **Rhizoctonia species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control**. Amsterdam: Springer, 1996. p. 379-390.
- BIDARTONDO, M.I. et al. High root concentration and uneven ectomycorrhizal diversity near *Sarcodes sanguinea* (Ericaceae): a cheater that stimulates its victims? **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 87, n. 12, p. 1783-1788, 2000.
- BIERMANN, B.; LINDERMAN, R.G. Use of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots, intraradical vesicles and extraradical vesicles as inoculum. **New Phytologist**, Cambridge, v. 95, n. 1, p. 97-105, 1983.

- BONFANTE, P.; GENRE, A. Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. **Nature Communications**, London, v. 1, p. 48, 2010.
- BONFIM, J.A. et al. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a Brazilian atlantic forest toposequence. **Microbial Ecology**, New York, v. 70, p. 1-14, 2015.
- BRUNDRETT, M. Diversity and classification of mycorrhizal associations. **Biological Reviews**, Cambridge, v. 79, n. 3, p. 473-495, 2004.
- BURGESS, T.; MALAJCZUK, N.; DELL, B. Variation in Pisolithus based on basidiome and basidiospore morphology, culture characteristics and analysis of polypeptides using 1D SDS-PAGE. **Mycological Research**, Cambridge, v. 99, n. 1, p. 1-13, 1995.
- CARDOSO, E.J.B.N. et al. Micorrizas arbusculares na aquisição de nutrientes pelas plantas. In: SIQUEIRA, J.O. et al. **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**. Lavras: Ed. UFLA, 2010. v. 1, p. 153-215.
- CASTELLANO, M.A. Current status of outplanting studies using ectomycorrhiza-inoculated forest trees. In: PFLEGER, F.; LINDERMANN, B (Ed.). **A reappraisal of Mycorrhizae in plant health**. St Paul: The American Phytopathological Society, 1994. p. 261-281.
- CASTELLANO, M.A.; MOLINA, R. Mycorrhizae. In: LANDIS, T.D. (Ed.). **The biological component: nursery pest and mycorrhizae manual**. Washington: USDA Forest Service, 1989. p. 101-167. (Agriculture Handbook, 674).
- CASTELLANO, M.A.; TRAPPE, J.M. Ectomycorrhizal formation and plantation performance of Douglas-fir nursery stock inoculated with Rhizopogon spores. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 15, n. 4, p. 613-617, 1985.
- BINI, D. **Aspectos microbiológicos em solo sob plantio consorciado de Acacia mangium e Eucalyptus grandis (plantação recém-instalada)**. 2012. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.
- FRANK, B. On the nutritional dependence of certain trees on root symbiosis with belowground fungi (an English translation of AB Frank's classic paper of 1885). **Mycorrhiza**, Berlin, v. 15, n. 4, p. 267-275, 2005.

GENRE, A. et al. Short chain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear Ca²⁺ spiking in *Medicago truncatula* roots and their production is enhanced by strigolactone. **New Phytologist**, Cambridge, v. 198, n. 1, p. 190-202, 2013.

GEORGE, E. et al. Water and nutrient translocation by hyphae of *Glomus mosseae*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 70, n. 11, p. 2130-2137, 1992.

HARLEY, J.L.; SMITH, S.E. **Mycorrhizal symbiosis**. London; New York: Academic Press, 1983. 483 p.

HECKMAN, D.S. et al. Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. **Science**, New York, v. 293, n. 5532, p. 1129-1133, 2001.

KASUYA, M.C.M. et al. Ectomicorrizas no Brasil: biologia e nutrição de plantas. In: SIQUEIRA, J.O. et al. (Org.). **Micorrizas 30 anos de pesquisas sobre micorrizas no Brasil**. Lavras: Ed. UFLA, 2010. p. 615-643.

LAMBAIS, M.R.; MEHDY, M.C. Suppression of endochitinase, -1, 3-endoglucanase, and chalcone isomerase expression in bean vesicular-arbuscular mycorrhizal roots under different soil phosphate conditions. **Molecular Plant Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 6, p. 75-75, 1993.

LARGENT, D.L.; SUGIHARA, N.; WISHNER, C. Occurrence of mycorrhizae on ericaceous and pyrolaceous plants in northern California. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 58, n. 21, p. 2274-2279, 1980.

MASSICOTTE, H.B.; MELVILLE, L.H.; PETERSON, R.L. Structural features of mycorrhizal associations in two members of the Monotropoideae, *Monotropa uniflora* and *Pterospora andromedea*. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 15, n. 2, p. 101-110, 2005.

MASSICOTTE, H.B. et al. Anatomical aspects of field ectomycorrhizas on *Polygonum viviparum* (Polygonaceae) and *Kobresia bellardii* (Cyperaceae). **Mycorrhiza**, Berlin, v. 7, n. 6, p. 287-292, 1998.

MEYER, F.H. **Distribution of ectomycorrhizae in native and man-made forests**. In: MARKS, G.C.; KOSLOWSKI, T.T. (Ed.). **Ectomycorrhizae: their ecology and physiology**. New York: Academic Press, 1973. p. 79-105.

MOLINA, R.; TRAPPE, J.M. Lack of mycorrhizal specificity by the ericaceous hosts *Arbutus menziesii* and *Arctostaphylos UV A-URSI*. **New Phytologist**, Cambridge, v. 90 n. 3, p. 495-509, 1982.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Micorriza. In: _____. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Ed. UFLA, 2002. v. 2, p. 543-716.

- NOGUEIRA, M.A.; CARDOSO, E.J.B.N. Mycorrhizal effectiveness and manganese toxicity in soybean as affected by soil type and endophyte. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, n. 2, p. 329-335, 2003.
- NOVAIS, R.F., SMYTH, T.J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. Viçosa: UFV, DPS, 1999. 399 p.
- PEREIRA, A.P.A. **Influência da profundidade do solo e do manejo de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mangium* na estrutura das comunidades microbianas do solo**. 2015. 102 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.
- PETERSON, R.L.; BONFANTE, P. Comparative structure of vesicular-arbuscular mycorrhizas and ectomycorrhizas. **Plant and soil**, Hague, v. 159, n. 1, p. 79-88, 1994.
- READ, D.J. et al. Symbiotic fungal associations in 'lower' land plants. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B: Biological Sciences**, London, v. 355, n. 1398, p. 815-831, 2000.
- REDECKER, D. et al. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). **Mycorrhiza**, Berlin, v. 23, n. 7, p. 515-531, 2013.
- REMY, W. et al. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 91, n. 25, p. 11841-11843, 1994.
- ROBERTSON, D.C.; ROBERTSON, J.A. Ultrastructure of *Pterospora andromedea* Nuttall and *Sarcodes sanguinea* Torrey mycorrhizas. **New Phytologist**, Cambridge, v. 92, n. 4, p. 539-551, 1982.
- SCHÜBLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105 n. 12, p. 1413-1421, 2001.
- SIDDIQUI, Z.A.; AKHTAR, M.S. Synergistic effects of antagonistic fungi and a plant growth promoting rhizobacterium, an arbuscular mycorrhizal fungus, or composted cow manure on populations of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 18 n. 3, p. 279-290, 2008.
- SIMON, L. et al. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. **Nature**, London, v. 363, p. 67-69, 1993.

SIQUEIRA, J.O. et al. **Micorrizas**: 30 anos de pesquisas no Brasil. Lavras: Ed. UFLA. 2010. 716 p.

SMITH, S.E.; READ, D.J. **Mycorrhizal symbiosis** 2nd ed. San Diego: Academic Press, 1997. 605 p.

TAYLOR, T.N. et al. Fossil arbuscular mycorrhizae from the Early Devonian. **Mycologia**, New York, v. 87, n. 4, p. 560-573, 1995.

TRISTÃO, F.S.M.; ANDRADE, S.A.L.D.; SILVEIRA, A.P.D.D. Arbuscular mycorrhizal fungi on the development of coffee plantlets using different organic substrates. **Bragantia**, Campinas, v. 65, n. 4, p. 649-658, 2006.

VALADARES, R.B.S. **Diversidade micorrízica em *Coppensia doniana* (Orchidaceae) e filogenia de fungos micorrízicos associados à subtribo Oncidiinae**. 2010. 94 p. (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 2010.

CAPÍTULO 13

BIORREMEDIAÇÃO

Cristiane Cipolla Fasanella, Elke JBN Cardoso

13.1. Introdução

Atualmente existe uma grande preocupação em torno dos impactos ambientais ocasionados por práticas antrópicas como, por exemplo, a contaminação dos solos causada pelo uso de herbicidas e inseticidas nas práticas agrícolas. Esses geram resíduos que se acumulam no meio ambiente, tornando-se um problema grave em todo o mundo. Devido a isso, hoje existem várias tentativas de minimizar o efeito desses resíduos para que não fiquem expostos no ecossistema, ocasionando um efeito negativo para as comunidades vivas existentes.

Uma das metodologias mais utilizadas neste intuito é a biorremediação. Esta pode ser definida como um conjunto de tecnologias, que utilizam processo(s) biológico(s) aplicados à recuperação ou remediação de áreas contaminadas. Ou seja, é uma técnica baseada na capacidade metabólica de microrganismos para transformar ou mineralizar contaminantes orgânicos em substâncias menos nocivas, as quais são integradas aos ciclos biogeoquímicos. Este método é considerado adequado e versátil, porque apresenta baixo risco para os

locais contaminados, visto que é um processo biológico; seu custo é baixo, apresentando uma relação custo/benefício favorável para o tratamento do local contaminado (KORDA et al., 1997; CRÁPEZ et al., 2002). Contudo, é importante ressaltar que o procedimento de biorremediação também pode trazer malefícios ao sistema, como a degradação parcial do composto alvo e formação de um subproduto mais tóxico. Além disso, este processo é muitas vezes lento e necessita de condições favoráveis de nutrientes, oxigênio, pH, composição, concentração e biodisponibilidade dos contaminantes, assim como das características físicas e químicas do ambiente contaminado (SCHINNER et al., 2003). A tabela 13.1 descreve as principais vantagens e desvantagens associadas ao processo de biorremediação.

Tabela 13.1 - Vantagens e desvantagens da biorremediação

| Vantagens | Desvantagens |
|--|--|
| <i>Baixo custo</i> | <i>Longa duração - não é considerado processo de aplicação rápida e imediata</i> |
| <i>Possibilidade de tratamento no local contaminado</i> | <i>Necessita conhecimento e histórico completo do local contaminado</i> |
| <i>Sem adição de qualquer produto químico</i> | <i>A degradação pode não ser completa</i> |
| <i>Aplicável a uma grande variedade de contaminantes</i> | <i>Presença de diferentes compostos - alguns compostos podem se adsorvidos ao solo</i> |

Esse processo tem sido considerado viável em diferentes tipos de contaminações como, por exemplo, em águas subterrâneas, lençóis freáticos, efluentes industriais, aterros sanitários, etc. Para validar esse processo é importante ressaltar que existem muitos fatores capazes de influenciar tal técnica. Entre eles, podemos destacar: distribuição espacial da contaminação, origem do resíduo, temperatura, pH, composição da contaminação, umidade, potencial redox, oxigênio dissolvido, presença de outros compostos tóxicos, etc.

Portanto, o objetivo da biorremediação é induzir e/ou acelerar os processos biológicos naturais, através das comunidades microbianas autóctones ou não, modificadas geneticamente ou não, para a obtenção de baixos níveis de detecção do poluente previamente estabelecido.

13.2. Base Biológica para a Biorremediação

A base biológica do processo de biorremediação está na biodegradação, processo comum encontrado e ativo na maior parte dos componentes da microbiota do solo. Por ser caracterizada comumente com ampla diversidade metabólica, e apta a decompor os constituintes mais variados que compõem a matéria orgânica, esta microbiota apresenta determinada capacidade de catabolizar moléculas dos contaminantes ambientais.

A microbiota presente no local, seja ela natural ou inoculada na área contaminada, deve apresentar a capacidade de degradação de determinados compostos tóxicos, transformando-os em gás carbônico e água, quando completamente mineralizados, ou em substâncias menos nocivas, as quais, logo em seguida, são incorporadas nos ciclos biogeoquímicos naturais.

Dentro deste contexto, pode-se imaginar que moléculas contaminantes com estrutura mais similar àquelas encontradas comumente nos solos devem ser passíveis de mais fácil degradação num processo de biorremediação. Esta é uma das características que influenciam na geração de novas moléculas a serem aplicadas nos mais diferentes ambientes, sendo a sua composição crucial para determinar a toxicidade dos xenobiontes.

13.3. Contaminantes dos Solos

Chama-se contaminante todo componente presente no solo em concentrações acima daquelas em que causam danos ao desenvolvimento de animais e plantas que ocupam este local (SHAYLER et al., 2009). De maneira geral, podem ser elencados como os principais contaminantes do solo os hidrocarbonetos (petróleo, plásticos), antibióticos, metais pesados, dentre outros (CÉSAR et al., 2009). Num contexto mais agrônomo, destaca-se o papel dos agroquímicos, que podem por vezes atingir níveis elevados nos solos, tornando-se contaminantes.

Os contaminantes do solo podem ser classificados de diversas maneiras, sendo que uma destas divisões dá origem a três grupos:

Compostos biodegradáveis: caracterizados como biodegradáveis na maioria das condições ambientais, apresentando composição molecular similar a moléculas que naturalmente ocorrem nos solos como, por exemplo, componentes da matéria orgânica.

Compostos persistentes: são biodegradáveis apenas sob determinadas condições ambientais como, por exemplo, apenas na presença de O_2 , quando processos metabólicos oxidativos são capazes de promover a quebra de determinados componentes.

Compostos recalcitrantes: moléculas que apresentam baixo nível de decomposição devido à atividade enzimática dos organismos do solo. A causa da recalcitrância pode estar relacionada às características do poluente, como baixa solubilidade, alta adsorção molecular aos componentes do solo, alta toxicidade do composto, ou à geração de compostos intermediários tóxicos aos organismos do solo.

13.4. Processos de Biorremediação

Embora sendo um processo versátil e de baixo custo, a biorremediação natural, em geral, ocorre de maneira muito lenta. Apesar de muitas estirpes de fungos e bactérias serem conhecidas como eficazes agentes de biorremediação, muitas destas são atuantes apenas sob condições específicas, encontradas comumente em ensaios de laboratório (VIDALI, 2001; BERNHARD-REVERSAT; SCHWARTZ, 1997).

Embora vários destes organismos possam existir nos mais diferentes ambientes, a maioria deles apresenta necessidade de condições ambientais específicas para funcionar plenamente, o que pode gerar uma situação difícil de se conseguir fora do laboratório. Isso porque nos locais de biorremediação eles não estão sozinhos, mas expostos a uma série de interações ecológicas, o que pode limitar sua atividade catalítica. Outra variável que interfere de forma determinante sobre a biorremediação é composta pelas condições ambientais ideais para que o potencial microbiano seja maximamente explorado.

A utilização da biorremediação é, portanto, condicionada a ajustes bióticos e abióticos do ambiente, de maneira a promover a

complementação perfeita entre o potencial metabólico do solo e a ocorrência de fatores propícios para que a mineralização da molécula contaminante ocorra. Por exemplo, em alguns casos, deve ser feita a inoculação de agentes promotores da degradação mas, apenas após a utilização de métodos de correção de características físicas e químicas do solo (CUYPERS, 2001; ZHU et al., 2001; YANG et al., 2009).

Esta miscelânea de oportunidades dá origem aos diferentes métodos de biorremediação, apresentados a seguir.

13.4.1. Local de ocorrência do processo de biorremediação

As tecnologias de biorremediação são geralmente classificadas como "*in-situ*" e "*ex-situ*". A biorremediação "*in situ*" envolve tratar o material contaminado no próprio local, ou seja, o processo de biodegradação ocorre no local contaminado. Quando se fala em biorremediação "*ex-situ*", a técnica utilizada consiste na remoção do material contaminado para tratamento em local externo ao de sua origem. As metodologias "*ex-situ*" são, em geral, mais eficientes do que os processos "*in situ*", o que se deve ao maior controle das condições ambientais na aplicação de métodos "*ex-situ*" (por exemplo, pelo uso de biorreatores). No entanto, nem sempre é possível a utilização destes métodos, como por exemplo, na biorremediação de grandes áreas de solo, onde a remoção deste material é inviável tanto do ponto de vista econômico, quanto da preservação do solo.

13.4.2. Bases biológicas dos processos de biorremediação

Tanto em metodologias "*in situ*" como em "*ex-situ*", existe uma variedade de metodologias descritas como ativadoras da biorremediação. No entanto, de maneira didática, as metodologias descritas para esta finalidade são apresentadas abaixo.

Os principais métodos de biorremediação "*in situ*" são:

Bioaumentação - aumento de população microbiana de controle, tendo como base a adição de microrganismos na região contaminada, ou seja, é a introdução de microrganismos alóctones, geralmente encontrados em produtos biotecnológicos que já são comercializados, ou autóctones, para a degradação

do contaminante. Quando se opta pela estratégia de inoculação de microrganismos alóctones, esses devem atuar em sinergismo com as espécies autóctones, sem interferir de forma negativa nos processos biogeoquímicos naturais;

Bioestimulação - estimulação da população microbiana autóctone, tendo como objetivo aumentar as taxas de biodegradação no local contaminado. Para se utilizar desse processo, deve existir no local contaminado uma comunidade microbiana natural capaz de degradar os contaminantes presentes e ter uma adaptação às condições ambientais prevalentes. A estimulação pode ser feita, por exemplo, através da correção do pH, equilibrando os nutrientes em relação à carga de carbono do poluente orgânico, do arejamento do solo, ou de outras intervenções nas condições reinantes (BURNS et al., 2000; RAMSAY et al., 2000; MENDELSSOHN; LIN, 2003).

Fitorremediação – é um processo de biorremediação indireta, no qual se utilizam as plantas disponíveis no ambiente para auxiliar na biodegradação do poluente. Para tal, é necessária a utilização de plantas que possuam determinadas características como, por exemplo: boa capacidade de absorção, acelerada taxa de crescimento, sistema radicular profundo, fácil colheita, e principalmente, plantas que apresentem uma grande resistência ao poluente e que fazem sua bioacumulação (COUTINHO; BARBOSA, 2007).

Bioventilação - bioestimulação por meio da adição de gases estimulantes, como O_2 ou CH_4 , para aumentar a atividade microbiana decompositora. Os gases, quando injetados, fornecem aos microrganismos condições de oxigenação adequadas, de forma que a degradação possa ser feita de forma eficiente (ÖSTERREICHER-CUNHA et al., 2004).

Já em relação às técnicas “*ex situ*” temos:

“Landfarming” - é baseado na aplicação de contaminantes ou rejeitos contaminados na superfície do solo não contaminado para a estimulação da degradação. Durante o processo o solo é arado e gradeado para promover a mistura uniforme do contaminante com a terra e a aeração do solo. No processo

de landfarming deve haver boa distância de vias fluviais e lençol freático profundo, impermeabilização do solo abaixo da linha de aração e inclinação mínima do terreno, a fim de evitar contaminações laterais ou em profundidade. Neste caso também podem ser utilizadas plantas para auxiliar na extração dos poluentes, plantas essas que são denominadas de hiperacumuladoras de certos metais, por exemplo. Este processo é bastante empregado para despoluição de resíduos da indústria petrolífera.

Compostagem – baseada no uso de microrganismos decompositores, mesofílicos e termofílicos, que fazem a decomposição das substâncias orgânicas e transformam o material contaminado em um composto que pode ser utilizado como fertilizante agrícola. O processo da compostagem é definido como a decomposição aeróbia de resíduos orgânicos por meio de populações microbianas, incluindo uma fase termofílica. Nessa técnica são construídas pilhas ou leiras de resíduos orgânicos a serem degradados, com manutenção de ambiente aeróbio (por insuflação de ar ou revolvimento da pilha) e umidade adequada (ao redor de 50% da capacidade de retenção de água). Outro ponto importante é a relação C/N do material e o tamanho das partículas. É um processo barato e fácil de ser monitorado; hoje em dia se reveste de importância fundamental para transformar os passivos ambientais (que são considerados "lixo") em outro produto com valor agregado, um adubo orgânico que recicla para a agricultura boa parte do material orgânico descartado e todos os macro e micronutrientes minerais que estavam contidos nos resíduos vegetais. Além disso, tem um papel importante na eliminação dos passivos ambientais, dos lixões e aterros sanitários.

Biopilha - envolve a construção de pilhas ou leiras do próprio solo contaminado para que ocorra uma estimulação da atividade microbiana aeróbia já presente dentro da pilha através de uma eficiente aeração (geralmente por meio de uma malha de dutos instalados na base da pilha). Em alguns casos, constrói-se um sistema de coleta do lixiviado, principalmente quando se utiliza um sistema de ajuste de umidade.

Biorreatores – Os biorreatores são uma espécie de tanques, nos quais é inoculado o material contaminado juntamente com a

microbiota. Podem ser de vários tipos e são muito úteis em degradar substâncias altamente recalcitrantes. É uma técnica considerada de alto custo pois há muitos gastos envolvidos no transporte do material contaminado, na construção de equipamentos para uma particular descontaminação, mão-de-obra adicional e energia. São utilizados principalmente por empresas em processos ligados à produção de produtos de alto custo.

13.5. Monitoramento do processo de biorremediação

Outro ponto importante num processo de biorremediação se refere ao monitoramento da degradação do contaminante. Este processo pode ser realizado de diferentes maneiras como, por exemplo, via quantificação da molécula contaminante ou pela utilização de bioindicadores.

Dentro das metodologias de monitoramento da quantidade de contaminantes no solo, destacam-se os métodos mais variados de química analítica, capazes de determinar a concentração exata da molécula alvo. No entanto, é importante destacar que na grande maioria dos casos estas metodologias são bastante dispendiosas em tempo e dinheiro, o que faz da utilização de metodologias alternativas algo bastante atrativo.

Os testes de ecotoxicidade são amplamente empregados para a avaliação dos efeitos adversos de agentes químicos sobre a biota terrestre e aquática e possibilitam a avaliação dos impactos de poluentes para os organismos do solo. Sendo assim, os testes de ecotoxicidade terrestre podem ser realizados para avaliar o potencial de bioacumulação do contaminante, fornecendo informações de toxicidade e biodisponibilidade, podendo ser uma importante ferramenta na avaliação do impacto ambiental e no auxílio do monitoramento de áreas degradadas (RAMOS et al., 2007; CARDOSO; ALVES, 2013).

13.6. Recuperação de solos degradados por meio da revegetação com utilização da biotecnologia microbiana

Solos muito degradados, altamente lixiviados, muito pobres em nutrientes e com um microbioma extremamente reduzido, como são, em sua maioria, os rejeitos de mineração, apresentam-se problemáticos com relação ao plantio e desenvolvimento de plantas. Uma maneira de superar sua grave deficiência em nutrientes minerais seria uma adubação

pesada com todos macro e micronutrientes. Entretanto, além de esse procedimento envolver altos custos, embora fornecendo os nutrientes minerais necessários, não poderia restabelecer condições físicas e biológicas adequadas para uma boa fertilidade do solo.

Contudo, uma maneira mais satisfatória de restabelecer as condições mínimas para o desenvolvimento vegetal é lançar mão de microrganismos que sabidamente apresentam interações positivas com os vegetais, alguns dos quais formam associações simbióticas mutualistas com as plantas. O primeiro ponto a considerar é a reposição do material orgânico que foi perdido pela decapitação do solo durante a mineração. A matéria orgânica mais recomendada seria um composto orgânico que, além do carbono indispensável também contém grande parte dos nutrientes minerais e uma infinidade de microrganismos para repor a microbiota do solo. Este método também pode ser menos oneroso se for possível preparar a compostagem de resíduos agrícolas obtidos na vizinhança do local, como esterco de gado, restos de colheita, podas de árvores, palhas e capins. O material humificado do composto ainda restabelece as características físicas do solo, como estruturação do solo, capacidade de retenção de água, diminuição da densidade e da compactação, entre outras. O segundo aspecto a ser levado em consideração deve ser a presença de nitrogênio no solo em quantidades adequadas às necessidades das plantas. O elemento nitrogênio é aquele do qual as plantas necessitam maiores quantidades, mas os adubos sintéticos são um insumo muito dispendioso, quase todo importado no Brasil. Esse é o motivo pelo qual se recomenda o primeiro plantio nos terrenos inférteis com plantas da família das Leguminosas que apresentam uma interação simbiótica com bactérias comumente denominadas de rizóbios, o que resulta na fixação biológica do nitrogênio (FBN) e deve-se proceder ao plantio de mudas pré-inoculadas com rizóbios (Figura 13.1). O fósforo, segundo nutriente mais utilizado pelas plantas, pode ser suplementado por meio da aplicação de fosfato de rocha ou de outro fosfato de baixa solubilidade, fazendo-se também a inoculação de fungos micorrízicos, os quais são fundamentais para uma adequada absorção de P pelas plantas.

Além disso, podem e devem ser utilizadas as bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP), quando disponíveis, e é aconselhável a cobertura das linhas de plantio com palhas, além da irrigação, quando necessário. Todos esses cuidados normalmente resultam em revegetação eficiente, o que permite uma recuperação relativamente rápida do solo, obtida por meio de técnicas de sustentabilidade ambiental (FRANCO et al., 1995; MENDES et al., 2010).

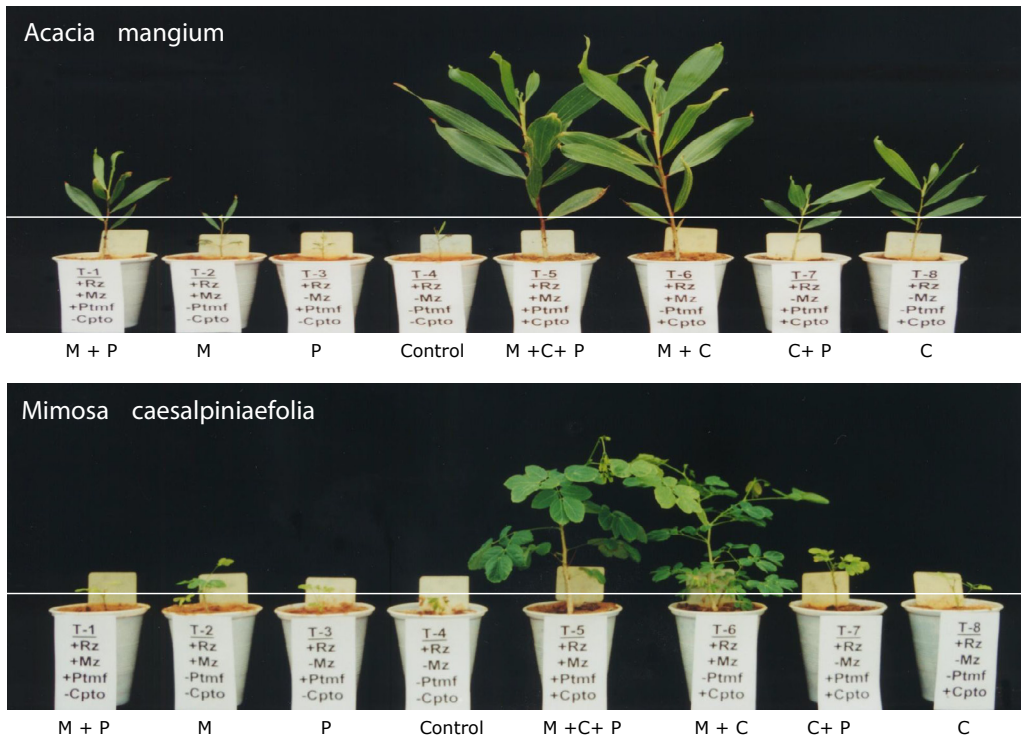


Figura 13.1 - Desenvolvimento de plantas leguminosas para recuperação ambiental utilizando-se de 'manejo microbiológico'. M (micorriza), P (fósforo de baixa solubilidade), C (composto orgânico). Todas as plantas foram inoculadas com rizóbio. Fotos: Mendes et al. (2006)

13.7. Considerações finais

A biorremediação é a técnica tida como ideal para grandes contaminações, principalmente para aquelas que envolvem um ambiente natural, apesar de que, muitas vezes, esta seja uma metodologia que leva mais tempo do que as demais. Apesar dos aspectos sustentáveis e do baixo custo de algumas das técnicas de biorremediação, o conhecimento dos fatores relacionados às comunidades microbianas (incluindo a diversidade e função) e das características ambientais dos locais contaminados são necessários para o êxito da abordagem. Esse conhecimento nem sempre pode ser acessado por somente uma

abordagem clássica, envolvendo o cultivo de microrganismos, mas também pela junção de métodos mais tradicionais e aqueles inovadores no estudo de grupos microbianos ativos nos solos.

13.8. Estudos de Caso

13.8.1. Estudo de Caso 1

De acordo com o conhecimento adquirido nesse capítulo você já é capaz de traçar algumas alternativas para um possível processo de biorremediação. Então vamos supor que você foi selecionado para um teste final em uma empresa que presta serviços de recuperação de áreas contaminadas. Para isso, eles pediram que você escreva um projeto para recuperar uma área de intersecção entre o mar e a terra; local onde ambos os ecossistemas são bastante diversos tanto na fauna como na flora. Essa contaminação foi dada por um derramamento de mais de 30 milhões de litros de petróleo. Eles pedem para que seja elaborado um projeto que apresente pelo menos duas soluções para o problema e que estejam bem desenvolvidas com seus prós e contras e, principalmente, tentando convencê-los de que essas seriam as duas melhores soluções a serem tomadas.

13.8.2. Estudo de Caso 2

Fez-se a compostagem de lixo doméstico, seguindo todos os preceitos para uma compostagem adequada e, durante um período de tempo, fez-se o monitoramento de diversos atributos do material em compostagem (JAHNEL et al., 1999). Os resultados são apresentados nas figuras abaixo (Figura 13.2). Baseando-se nos gráficos, faça a interpretação e o histórico de todo o processo.

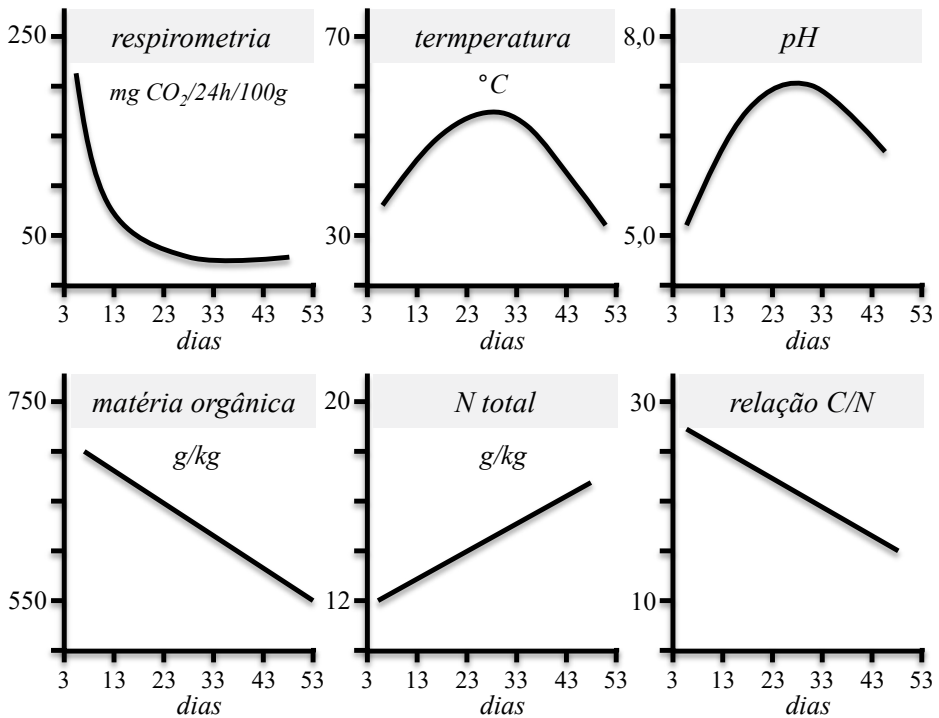


Figura 13.2 - Dados químicos e biológicos de um processo de compostagem de lixo doméstico (Esquema modificado de Jahnel et al., 1999).

Referências

BERNHARD-REVERSAT, F.; SCHWARTZ, D. Change in lignin content during litter decomposition in tropical forest soils (Congo): comparison of exotic plantations and native stands, **Comptes Rendus de l'Academie de Sciences**. Serie IIa, Paris, v. 325, n. 6, p. 427-432, 1997.

BURNS, K.A.; CODI, S.; DUKE, N.C. Gladstone, Australia Field studies: weathering and degradation of hydrocarbons in oiled mangrove and salt marsh sediments with and without the application of an experimental bioremediation protocol. **Marine Pollution Bulletin**, Amsterdam, v. 41, p. 392-402, 2000.

CARDOSO, E.J.B.N.; ALVES, P.R. Soil ecotoxicology. In: GHOSHIA, B. (Org.). **Ecotoxicology**. InTech, 2013. p. 27-50.

- CÉSAR, M.E.F. et al. Particle size and concentration of poly (-caprolactone) and adipate modified starch blend on mineralization in soils with differing textures. **Polymer Testing**, New York, v. 28, p. 680-687, 2009.
- COUTINHO, H.C.; BARBOSA, A.R. Fitorremediação: considerações gerais e características de utilização. **Silva Lusitana**, Lisboa, v. 15, n. 1, p. 103-117, 2007.
- CRÁPEZ, M.A.C. et al. Tratamento para derrames de petróleo. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 30, p. 32-37, 2002.
- CUYPERS, C. **Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils and sediments**: prediction of bioavailability and characterization of organic matter domains. 2001. 161 p. Thesis (Ph.D.) - Wageningen University, Wageningen, 2001.
- FRANCO, A.A. et al. **Uso de leguminosas florestais noduladas e micorrizadas como agentes de recuperação e manutenção da vida do solo: um modelo tecnológico**. In: ESTEVES, F.A. (Ed.). **Oecologia brasiliensis**: estrutura, funcionamento e manejo de ecossistemas brasileiros. Piracicaba: ESALQ, 1995. p. 459-467.
- JAHNEL, M.C.; MELLONI, R.; CARDOSO, E.J.B.N. Maturidade de composto de lixo urbano. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, n. 2, p. 301-304, 1999.
- KORDA, A. et al. Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 48, p. 677-686, 1997.
- MARGESIN, R. et al. Characterization of hydrocarbon degrading microbial populations in contaminated and pristine Alpine soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 3085-3092, 2003
- MENDELSSOHN, I.A.; LIN, Q. **The development of bioremediation for oil spill cleanup in coastal wetlands**. New Orleans: U.S. Department of Interior, Minerals Management Service, Gulf of Mexico OCS Region, 2003.
- MENDES FILHO, P.F. et al. Evaluating the potential of forest species under "microbial management" for the restoration of degraded mining areas. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 208, p. 79-89, 2010.
- ÖSTERREICHER-CUNHA, P. et al. Evaluation of bioventing on a gasoline-ethanol contaminated disturbed residual soil. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 110, n. 63 - 76, 2004.

RAMOS, A.S.; EGLER, S.G., CASTILHOS, Z.C. Implantações do laboratório de ecotoxicologia aplicada a indústria mínero-metalúrgica (LECOMIN) do CETEM. In: JORNADA DO PROGRAMA DE CAPACITAÇÃO INTERNA, 1., 2007, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Centro de Tecnologia Mineral, 2007.

RAMSAY, M.A. et al. Effect of bioremediation community in oiled mangrove sediments. **Marine Pollution Bulletin**, Amsterdam, v. 41, p. 413–419, 2000.

SHAYLER, H.; MCBRIDE, M.; HARRISON, E. **Sources and impacts of contaminants in soils**. Ithaca; New York: Cornell Waste Management Institute, 2009. 6 p.

VIDALI, M. Bioremediation: an overview. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 73, n. 7, p. 1163–1172, 2001.

YANG, S.Z. et al. Bioremediation of oil spills in cold environments: a review. **Pedosphere**, Beijing, v. 19, p. 371–381, 2009.

ZHU, X. et al. **Guidelines for the bioremediation of marine shorelines and freshwater wetlands**. Cincinnati: U.S. Environmental Protection Agency, 2001. 156 p.

CAPÍTULO 14

INTRODUÇÃO AOS MÉTODOS INDEPENDENTES DE CULTIVO NO ESTUDO DA MICROBIOLOGIA DO SOLO

Ademir Durrer, Fernando Dini Andreote

14.1. Introdução

Os capítulos anteriores demonstraram o quanto complexo é o ambiente solo e sua comunidade microbiana. Neles aprendemos os maiores detalhes sobre a sua ampla biodiversidade e o quanto isso é importante para a manutenção da sustentabilidade do sistema, seja ele natural ou agrícola. Contudo, pouco foi discutido a respeito de metodologias as quais nos permitem acessar e identificar a microbiota presente neste complexo ambiente, fato que iremos abordar neste capítulo.

O cultivo de microrganismos e técnicas moleculares independentes de cultivos são as metodologias que permitem explorar a diversidade microbiana presente em diferentes ecossistemas. No entanto, uma vez que a diversidade microbiana nos solos é enorme, e a adaptação dos diferentes organismos se dá em condições distintas uma das outras, pode-se imaginar que apenas uma minoria pode ser facilmente cultivada em condições de laboratório (STALEY; KONOPKA, 1985; AMANN et al., 1995). Sabe-se hoje que o cultivo e o isolamento de microrganismos, apesar de tradicionais, abrangem apenas valores entre 0,1% e 10% da comunidade bacteriana no solo (TORVISK et al., 1996). Se considerarmos uma placa de cultivo na qual as condições nutricionais e físicas são constantes e

homogêneas, podemos facilmente observar a contradição em representar as comunidades microbianas do solo por meio de colônias obtidas em meios de cultivo (AMANN et al., 1995). Estudos recentes, focados na descrição de grupos bacterianos presentes no solo, porém de difícil cultivo, têm revelado a estratégia evolutiva desses organismos, como a organização genômica compacta, o que leva a uma maior eficiência na multiplicação celular, porém ligada a uma grande dependência da interação com demais organismos para completar seu ciclo vital (VAN SLUYS et al., 2002; DINI-ANDREOTE et al., 2012). Assim sendo, não apenas as condições de cultivo, mas nossa visão antrópica de obter os componentes das comunidades microbianas dos solos de forma isolada, dificulta o uso de métodos dependentes de cultivo para a o estudo e entendimento de forma mais robusta dessas comunidades.

Neste sentido, a aplicação das técnicas chamadas de independentes de cultivo, baseadas na detecção e análise da diversidade de ácidos nucleicos (*i.e.* DNA ou RNA) em amostras ambientais é fundamental nos estudos de diversidade microbiana dos solos, permitindo uma análise mais fiel da estrutura das comunidades acessadas (RANJARD et al., 2000; ANDREOTE et al., 2009).

14.2. Metodologias independentes de cultivo

Dentro destas metodologias de análise, existem alguns subgrupos, como as análises baseadas em um gene (baseadas na amplificação do gene alvo por PCR), ou análises que contemplam todos os genes de maneira conjunta (metagenômica e metatranscriptômica). Estas análises passam atualmente por um intenso processo de automatização, o que é possível devido à evolução nas metodologias e na redução do custo do sequenciamento de DNA (item 14.3). Isto faz com que seja possível trabalhar com um maior número de amostras e acessar uma enorme quantidade de indivíduos em cada uma delas, trazendo grande robustez às inferências realizadas.

Ecologicamente, essas análises são essenciais, pois permitem que dentro de comunidades compostas por um grande número de grupos taxonômicos tenha-se a amostragem de um grande número de indivíduos, gerando assim a cobertura ecológica necessária para se inferir de forma concreta sobre a composição e a resposta de tais comunidades frente a diferentes condições ambientais estudadas. O exemplo pioneiro neste tipo

de análise em solos enumerou as diferenças encontradas na composição do microbioma de solos de diferentes países por meio da análise de um grande número de sequências do gene 16S RNAr (ROESCH et al., 2007).

A maioria dos estudos baseados em um gene se referem à taxonomia dos grupos microbianos, o que é comumente realizado com base em sequências dos operons ribossomais (gene 16S RNAr para bactérias e arqueias, e gene 18S RNAr ou regiões ITS para fungos) (HEUER et al., 1997; ANDERSON et al., 2003). A amplificação desses genes a partir de DNA ou cDNA (convertido a partir de RNA) obtidos de amostras de solo, dá suporte a análises posteriores, gerando informações sobre a estrutura das comunidades microbianas alvos de estudo (métodos de *fingerprinting*), a abundância (quantificação), ou a composição taxonômica dos organismos presentes nessas comunidades (métodos de sequenciamento) (ANDREOTE et al., 2009).

No entanto, para obter informações correlacionadas com os papéis desempenhados por grupos microbianos nos solos, outros genes vêm sendo utilizados em estudos de microbiologia molecular, com destaque para os genes relacionados a etapas específicas dentro dos ciclos biogeoquímicos. Dentre estes, os genes mais utilizados são aqueles relacionados à ciclagem de nitrogênio (*nifH* – fixação biológica de nitrogênio; *amoA* – nitrificação; *nirK*, *nosZ* - desnitrificação), enxofre (*dsrB* – redução de sulfato; *aprA* – redução e oxidação do enxofre) ou carbono (*mcrA* – metanogênese, *pmoA* - metanotrofia) (HANSON; HANSON, 1996; HENCKEL et al., 2000; GEETS et al., 2006; HENRY et al., 2006; BERNHARD et al., 2007). Outras funções podem também ser estudadas, sendo o único fator limitante a fiel relação da presença de um gene com a observação do fenótipo desejado nos organismos que hospedam a sequência de DNA no ambiente.

Considerando as análises mais amplas, primeiramente devemos ponderar a metagenômica, a qual surge como uma grande alternativa para descrever a diversidade microbiana do solo, contemplando em uma mesma análise as informações taxonômicas e funcionais presentes na comunidade. Este termo (metagenoma) foi cunhado em 1998 para representar os genomas da microbiota total encontrada em uma comunidade (HANDELSMAN et al., 1998). Esta estratégia oferece uma alternativa para a exploração do potencial metabólico de microrganismos que não são recuperados por métodos baseados em cultivo. O método consistia inicialmente na clonagem de fragmentos grandes de DNA (40 a 100 kb), obtidos a partir de amostras ambientais, em vetores do tipo BAC

(*Bacterial Artificial Chromosome*) ou cosmídeos e a análise das bibliotecas resultantes em busca de uma nova expressão fenotípica na linhagem hospedeira de *Escherichia coli* (HANDELSMAN et al., 1998).

No entanto, com o desenvolvimento das tecnologias de sequenciamento massivo (item 14.3), alterações surgiram neste conceito, sendo hoje possível acessar amplamente a informação genética contida em amostras de solo excluindo-se a etapa de clonagem. Este tipo de análise é bastante interessante pela possibilidade de descrever de maneira representativa os genes funcionais e taxonômicos conjuntamente, colocando estes enfoques em uma mesma análise, o que permite a melhor inferência sobre a relação entre a estrutura e a funcionalidade microbiana dos solos.

O primeiro trabalho que utilizou este tipo de metodologia conseguiu reconstruir genomas bacterianos por meio do sequenciamento do DNA diretamente extraído de amostras de uma mina ácida, onde poucos grupos microbianos compõem o microbioma (TYSON et al., 2004). Outro exemplo desta aplicação buscou descrever a diversidade filogenética e funcional da comunidade microbiana presente em amostras de gelo glacial (SIMON et al., 2009), onde os resultados demonstraram parte do metabolismo microbiano neste ambiente, com destaque para a presença de genes de adaptação à psicofilia.

Em solos, este tipo de análise vem sendo amplamente utilizado, com um dos primeiros trabalhos realizados para a comparação da microbiota, suas funcionalidades e potencial biotecnológico com base no sequenciamento do DNA diretamente retirado do solo (TRINGE et al., 2005). Mais recentemente, este tipo de análise vem sendo empregado na descrição de novas enzimas e na identificação da resposta da microbiota do solo a eventos de contaminação (FIERER et al., 2013).

Em relação aos biomas brasileiros, o microbioma presente nos solos de manguezais foi descrito por este tipo de análise (ANDREOTE et al., 2012), em que se nomearam os principais organismos componentes desta comunidade e se descreveram as principais transformações metabólicas envolvidas nos ciclos biogeoquímicos do nitrogênio, carbono e enxofre. Outros biomas brasileiros têm sido explorados com base neste tipo de análise, sendo estes sumarizados em um artigo recentemente publicado por Pyro et al. (2014).

Vale a pena comentar sobre as quantidades variadas de sequências de DNA obtidas em análises metagenômicas, as quais apresentam baixa ou nenhuma similaridade com aquelas presentes em bancos de dados. Isto demonstra o potencial desta análise em descrever novos genes, ou novos arranjos genômicos, distintos daqueles já conhecidos na literatura. Este grupo de sequências foi inicialmente tratado como algo de menor importância no início dos estudos metagenômicos, mas tem recentemente atraído bastante atenção, principalmente no intuito de desvendar a possível função contida nessas sequências de DNA (TOBAR-TOSSE et al., 2013).

Na mesma linha de análise, existe a possibilidade de se basear o sequenciamento na porção funcional do microbioma, utilizando moléculas de RNA como molde, em um tipo de estudo denominado de metatranscriptômica. Neste contexto, a metatranscriptômica aparece como uma metodologia poderosa para determinar padrões de expressão gênica de comunidades microbianas (PORETSKY et al., 2005; FRIAS-LOPEZ et al., 2008). Em contraste com a metagenômica, que fornece uma análise sobre a estrutura genética da comunidade, a metatranscriptômica identifica quais destes genes estão sendo ativamente transcritos no ambiente avaliado (GILBERT et al., 2008; PORETSKY et al., 2010).

Analisando amostras de comunidades microbianas marinhas, Gilbert et al. (2008) descreveram a alta eficiência desta metodologia e destacaram a possibilidade de detectar genes pertencentes a muitas famílias nunca anteriormente descritas em análises baseadas em moléculas de DNA. Em solos, alguns estudos utilizaram esta metodologia para a descrição de genes eucarióticos expressos sob diversas condições, como em solos de floresta (DAMON et al., 2012), ou na determinação de genes relacionados à resistência a metais pesados (LEHEMBRE et al., 2013). O foco inicial em eucariotos se deu devido ao método de separação do RNAm do RNA total. Uma vez que a grande maioria do RNA obtido é de origem ribossomal, a separação mais eficiente é por purificação em colunas poliI, onde os RNAm que possuem cauda poliA ficam retidos. No entanto, estes representam apenas a fração eucariótica das comunidades. O acesso aos transcritos de bactérias e arqueias se dá por meio do sequenciamento do RNA total, ou por meio de separação do RNAm desses organismos com o uso de hibridização por sondas para remoção do RNAr, como descrito por He et al. (2010). Resta ainda a possibilidade de sequenciar todo o RNA extraído, usando assim as sequências de genes ribossomais para uma análise taxonômica dos grupos com metabolismo ativo na amostra, ao

passo que as sequências de RNAm, mesmo que em menor número, são utilizadas para a análise das funções ativas na amostra. Isto foi feito em um dos primeiros trabalhos de metatranscriptômica em solos, em que se realizou uma análise conjunta da taxonomia e funcionalidade do microbioma de solos de uma área de preservação na Alemanha (URICH et al., 2008). Uma revisão recente enumera os estudos realizados com base nesta técnica, e comenta sobre as variáveis presentes nos estudos de metatranscriptômica de solo (CARVALHAIS et al., 2012). Esta ferramenta tem grande potencial de uso na descrição da atividade microbiana encontrada em diferentes solos brasileiros, levando à descrição dos grupos ativos nos diferentes ambientes e sob distintas condições de conservação e uso do solo.

É importante destacar que não existe uma metodologia perfeita, a qual forneça todo tipo de informação sobre as comunidades microbianas do solo, mas existem metodologias adequadas para responder às diferentes questões que são geradas ao longo do desenvolvimento dos trabalhos focados no microbioma dos solos. Numa análise comparativa, é possível verificar a vantagem de metodologias baseadas em PCR devido ao melhor detalhamento que a mesma proporciona no acesso ao grupo alvo (maior cobertura de análise, por exemplo), enquanto que as 'ômicas' geram dados mais completos sobre taxonomia e funções microbianas, porém com uma cobertura menor da comunidade (normalmente representando principalmente os grupos mais abundantes). Ainda cabem nesta comparação, o custo para a obtenção dos dados e as análises dos mesmos, que requerem habilidades específicas e na grande maioria das vezes recursos computacionais de grande capacidade de processamento e tempo de análise.

14.3. Evolução dos métodos e do custo do sequenciamento de ácidos nucleicos

O sequenciamento de DNA é a base da evolução das metodologias atuais empregadas no estudo de comunidades microbianas. Pode-se dizer que anteriormente ao surgimento destas, a microbiologia viveu sua fase mais estagnada, sendo os conhecimentos morfológicos e bioquímicos de células microbianas já não mais capazes de atribuir características diferenciais aos organismos cultivados, os quais compunham a base dos estudos de caracterização e de ecologia microbiana.

As metodologias capazes de gerar as sequências do material genético têm evoluído de forma acentuada nos últimos anos. Se inicialmente os estudos baseados em sequências de DNA eram realizados por poucos grupos de pesquisa, devido ao seu elevado custo e à necessidade de equipamentos especiais, atualmente estes estão amplamente disseminados entre os pesquisadores, principalmente para os que atuam nas áreas de ecologia microbiana e microbiologia ambiental.

O método de Sanger, o primeiro a ser descrito com esta finalidade, no ano de 1977, foi usado para sequenciar genes, fragmentos de DNA genômicos e até mesmo genomas pequenos, como o do bacteriófago ϕ X174 (5.386 pb) (SANGER et al., 1977) e o da bactéria *Haemophilus influenzae* (1.8 Mb) (FLEISCHMANN et al., 1995).

Esta metodologia passou por diversas adaptações as quais ampliaram a escala de trabalho, sendo a maior delas a automatização do sistema por sequenciamento em capilares, a qual possibilitou seu uso no estudo de genomas maiores, sendo o maior deles o sequenciamento do genoma humano, o qual foi resultado de mais de uma década de trabalho, sendo finalmente anunciado no ano de 2001 (VENTER et al., 2001).

No entanto, devido à necessidade de se clonar os fragmentos anteriormente ao seu sequenciamento e à capacidade de gerar poucas sequências por escala de tempo, tal metodologia possuía um elevado custo e baixo rendimento, principalmente quando empregada no estudo de genomas maiores ou mesmo daqueles que demandavam um maior número de sequências por organismos e/ou ambiente de forma concomitante.

O esperado avanço surgiu com o desenvolvimento das tecnologias nomeadas de sequenciadores de segunda geração (*next generation sequencing*) ou NGS, as quais não necessitam da clonagem prévia do material a ser sequenciado, e geram quantidades muito maiores de informação por tempo de processamento. Entre tais tecnologias estão aquelas desenvolvidas pelas empresas Roche (pirosequenciamento 454), Life Technologies (Solid, IonTorrent) e Illumina (HiScan, HiSeq2000), dentre outras. Tais tecnologias são concorrentes no mercado e têm levado ao amplo acesso da informação genética de organismos específicos, sejam estes encontrados em cultura pura ou em comunidades ambientais complexas. A grande vantagem que acompanha o montante de dados gerado é o custo do sequenciamento, o qual se reduziu drasticamente

ao longo dos últimos anos, obedecendo à chamada Lei de Moore, inicialmente usada para descrever o avanço na capacidade de análise de dados computacionais e atualmente usada para prever o avanço na capacidade de se gerar informações genéticas a partir de amostras biológicas. (Figura 14.1).

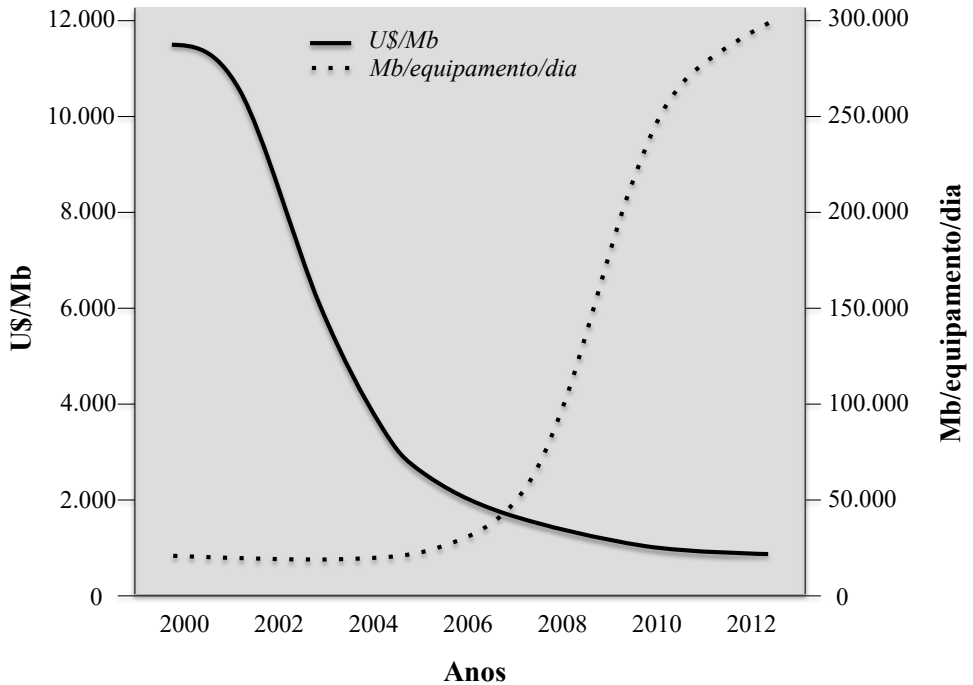


Figura 14.1 - Evolução do custo e da quantidade de dados gerados ao longo do desenvolvimento das metodologias de sequenciamento de DNA.

Referências

- AMANN, R.I.; LUDWING, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 59, p. 143–169, 1995.
- ANDERSON, I.C.; CAMPBELL, C.D.; PROSSER, J.I. Diversity of fungi in organic soils under a moorland - Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) gradient. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, p. 1121–1132, 2003.
- ANDREOTE, F.D.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, p. 417–432, 2009.
- ANDREOTE, F.D. et al. The microbiome of Brazilian mangrove sediments as revealed by metagenomics. **PLoS One**, São Francisco, v. 7, n. 6, e38600, 2012.
- BERNHARD, A.E. et al. Functionally distinct communities of ammonia-oxidizing bacteria along an estuarine salinity gradient. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 9, p. 1439–1447, 2007.
- CARVALHAIS, L.C. et al. Application of metatranscriptomics to soil environments. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 91, p. 246–251, 2012.
- DAMON, C. et al. Metatranscriptomics reveals the diversity of genes expressed by eukaryotes in forest soils. **PLoS One**, São Francisco, v. 7, n. 1, e28967, 2012.
- DINI-ANDREOTE, F. et al. Bacterial genomes: habitat specificity and uncharted organisms. **Microbial Ecology**, New York, v. 64, p. 1–7, 2012.
- FIERER, N. et al. Reconstructing the microbial diversity and function of pre-agricultural tallgrass prairie soils in the United States. **Science**, New York, v. 342, n. 6158, p. 621–624, 2013.
- FLEISCHMANN, R.D. et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. **Science**, New York, v. 269, p. 496–512, 1995.
- FRIAZ-LOPEZ, J. et al. Microbial community gene expression in ocean surface waters. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America of the USA**, Washington, v. 105, p. 3805–3810, 2008.
- GEETS, J. et al. *dsrB* gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 66, p. 194–205, 2006.

GILBERT, J.A. et al. Detection of large numbers of novel sequencer in the metatranscriptomes of complex marine microbial communities. **PloS One**, São Francisco, v. 3, p. 3042, 2008.

HANDELSMAN, J. et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemical Biology**, Oxford, v. 5, p. 245–24, 1998.

HANSON, R.S.; HANSON, T.E. Methanotrophic bacteria. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 60, p. 439-471, 1996.

HE, S. et al. Validation of two ribosomal RNA removal methods for microbial metatranscriptomics. **Nature Methods**, London, v. 7, n. 10, p. 807-12, 2010.

HENCKEL, T.; ROSLEV, P.; CONRAD, R. Effects of O₂ and CH₄ on presence and activity of the indigenous methanotrophic community in rice field soil. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 2, p. 666-679, 2000.

HENRY, S. et al. Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 5181-5189, 2006.

HEUER, H. et al. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3233–3241, 1997.

LEHEMBRE, F. et al. Soil metatranscriptomics for mining eukaryotic heavy metal resistance genes. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 15, n. 10, p. 2829-2840, 2013.

PORETSKY, R.S. et al. Analysis of microbial gene transcripts in environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 4121–4126, 2005.

PORETSKY, R.S. et al. Transporter genes expressed by coastal bacterioplankton in response to dissolved organic carbon. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 12, p. 616–627, 2010.

PYLRO, V.S. et al. Brazilian Microbiome Project: revealing the unexplored microbial diversity challenges and prospects. **Microbial Ecology**, New York, v. 67, p. 237-241, 2014.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, Paris, v. 151, p. 167-177, 2000.

ROESCH, L.F. et al. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **The ISME Journal**, New York, v. 1, p. 283-290, 2007.

SANGER, F. et al. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. **Nature**, New York, v. 265, p. 687–695, 1977.

SIMON, C. et al. Phylogenetic diversity and metabolic potential revealed in a glacier ice metagenome. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 7519–7526, 2009.

STALEY, J.T.; KONOPKA, A. Measurement of *in situ* activities of non-photosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 39, p. 321–346, 1985.

TOBAR-TOSSE, F. et al. Exploration of noncoding sequences in metagenomes. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 3, e59488, 2013.

TORSVIK, V.; SORHEIM, R.; GOKSOYR, J. Total bacterial diversity in soil and sediment communities: a review. **Journal of Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 17, p.170-178, 1996.

TRINGE, S.G. et al. Comparative metagenomics of microbial communities. **Science**, New York, v. 308, n. 5721, p. 554-557, 2005.

TYSON, G.W. et al. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. **Nature**, London, v. 428, n. 6978, p. 37-43, 2004.

URICH, T. et al. Simultaneous assessment of soil microbial community structure and function through analysis of the meta-transcriptome. **PLoS One**, San Francisco, v. 3, n. 6, e2527, 2008.

VAN SLUYS, M.A. et al. Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 169-189, 2002.

VENTER, J.C. et al. The sequence of the human genome. **Science**, Washington, v. 291, p.1304–1351, 2001.

