

A DIVERSIDADE BACTERIANA EM SOLOS CULTIVADOS COM PLANTIO DIRETO INTEGRADO A PECUÁRIA

P.S. Ferreira¹; Amoacy C. Fabrício²; T. Langenbach^{1}*

1. Departamento de Microbiologia Geral, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-590, Rio de Janeiro, Brasil; 2. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Agropecuária Oeste, Br 163 (Km 253,6) C.P.661, Dourados, Mato Grosso do Sul; *email: langenbach@micro.ufrj.br.
Financiamento: PRONEX (CNPq), FAPERJ.

INTRODUÇÃO

O estudo dos microorganismos em solos tratados agronomicamente é fundamental para determinar os processos microbiológicos e a diversidade de espécies que possam estar relacionados com a sustentabilidade ambiental e a produtividade. O grande desafio da atualidade é avaliar a relação entre a diversidade microbiana e as funções de seus componentes no solo (Griffiths *et al*, 2001). Isto permite uma compreensão mais ampla dos agroecossistemas. O presente trabalho tem como objetivo avaliar a integração lavoura/pastagem no sistema de plantio direto, sobre o perfil fenotípico (metabólico) e genotípico das populações bacterianas do solo.

MATERIAL E MÉTODOS

Campo Experimental

O presente trabalho foi realizado em parceria com *Embrapa Agropecuário Oeste*, Dourados, Mato Grosso do Sul. Os sistemas agrícolas avaliados estão descritos na Tabela 1 (Salton, 1996).

TABELA 1: Cronograma de Cultivos e Pastagem do Experimento de Campo.

Sistemas	verão	inv.	verão	inv	verão	inv	verão	inv.
	95/96	1996	96/97	1997	97/98	1998 *	98/99	99
RN	Vegetação de Cerrado							
PC	Soja	Aveia	Soja	Aveia	Soja	Aveia	Soja	Aveia
SI-A	Soja	Aveia	Soja	Aveia	<i>Brachiaria decumbes</i> e milho (pastagem)			
SI-B	<i>Brachiaria decumbes</i> e milho				Soja	Aveia	Soja	Aveia
PP	<i>Brachiaria decumbes</i> (pastagem)							

RN= solo de Reserva natural, sem manejo agrícola; PC= plantio convencional; SI= Sistema integrado lavoura/pastagem; PP= pastagem permanente.

O manejo convencional (PC) foi realizado com o preparo do solo com duas gradagens e cultivo com soja (*Glycine Max*) e aveia (*Avena strigosa* Schreb). As glebas SI-A e SI-B correspondem aos sistemas integrados A e B, constaram da integração entre lavoura (2 anos) e pastagem (2 anos). A diferença entre A e B é que a primeira começou com lavoura (A) e a segunda com pastagem (B). A implantação tanto da lavoura como da pastagem foi no sistema plantio direto. A gleba pastagem permanente (PP) foi sempre coberta com *Brachiaria decumbens*. A gleba Reserva representa o solo sem tratamento agrícola, com vegetação natural espontânea.

Amostragens de Solo

Na área experimental foi traçada uma rede de pontos equidistantes de 30 m. Todas as amostras foram retiradas nestes mesmos pontos, e foram compostas da mistura de diferentes réplicas colhidas na profundidade de 0 a 10 cm. As coletas foram realizadas no inverno de 1998 (Tabela 1) durante a semeadura (junho), florescência (julho) e colheita (setembro) da safra da época.

Contagens das Bactérias Heterotróficas e Fungos

As amostras de solo foram conservadas e posteriormente, utilizadas para as contagens de bactérias heterotróficas e fungos. As populações de bactérias foram enumeradas por NMP (Page *et al.*, 1982) contendo meio nutritivo e os fungos por espalhamento em placa em meio sólido PDA (Page *et al.*, 1982). Todos os tubos e placas foram incubados a 30°C por períodos de 48h para bactérias e de 72h até 7 dias, no caso dos fungos.

Identificação das Bactérias por BIOLOG e índice de Diversidade Fenotípica

A análise do perfil bioquímico dos isolados foi feita através do kit BIOLOG (BIOLOG®, CA, USA) (Garland & Mills, 1991). Foram isoladas 100 estirpes do solo no período de florescência das culturas de 1998, todas foram inoculadas para identificação no kit BIOLOG, sendo que, 26 estirpes não apresentaram padrão compatível com o banco de dados existente para identificação pelo BIOLOG® e 8 tornaram-se não cultiváveis. Os resultados de assimilação nos kits foram analisados por programa de agrupamento de estirpes para biotipagem do fabricante (BIOLOG®, CA, USA). A partir dos agrupamentos das estirpes com identificação de mais de 90% de similaridade com o banco de dados (N = 66), foi possível utilizar o índice de Shannon (H') proposto por Mills & Wassel (1980), e calcular a diversidade fenotípica (metabólica) de cada amostra de solo estudado.

PCR do DNA total extraído dos Solos

Para o estudo da diversidade genotípica foram feitos PCRs (Sambrook *et al.*, 1989) com os oligonucleotídeos F984-GC e R1378 (Heuer *et al.*, 2001) amplificando fragmentos de 450pb do gene 16S rDNA a partir do DNA total extraído dos solos conforme descrito por Elsas & Smalla (Akkermans *et al.*, 1995).

DGGE na Análise de Diversidade Microbiana

Os amplicons (fragmentos de 450pb) obtidos com PCR 16S rDNA foram analisados em géis de poliacrilamida com gradiente de desnaturação (“Denaturing Gradient Gel Electrophoresis – DGGE”) (Akkermans *et al.*, 1995; Heuer, *et al.* 2001). Os géis apresentavam gradiente de desnaturação de 40% a 58%. A eletroforese foi feita a 60°C e 100V por 18h. Os amplicons foram visualizados como bandas no gel de DGGE após coloração com nitrato de prata (Akkermans *et al.*, 1995). Os padrões das bandas originaram perfis comparáveis entre os solos, que foram avaliados com auxílio de “Molecular Analyst Fingerprint software” (BioRad, New York, USA). Estes perfis foram reunidos com o algoritmo UPGMA, e analisados com Dice a 1%. Foram feitos dois dendogramas de similaridade baseados nos perfis encontrados, o primeiro analisando a presença e ausência de bandas entre os solos, e o segundo, após a aplicação da correlação Pearson ($p < 0,05$), considerando os padrões de intensidade das bandas

dos mesmos perfis. Os perfis de cada solo foram comparados entre si, e em diferentes estágios de crescimento da planta (semeadura e a florescência).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Contagem microbiana e a diversidade fenotípica bacteriana

Na Tabela 2 encontramos os resultados de contagem de bactérias e fungos totais, e podemos observar que em RN, a diferença entre as contagens pode estar relacionada com o estresse hídrico do solo, pois as chuvas no período da semeadura foram de 11mm, sendo 6,2mm na florescência, e 25,4mm na colheita (centro meteorológico da *Embrapa Agropecuária Oeste*), o que pode ter influenciado no aumento das contagens na colheita. As glebas SI-B e PC também apresentaram, no período de florescência, aumento no número de bactérias e fungos (Tabela 2) o que coincidiu com maior diversidade fenotípica (bacteriana) expressa por H' (Tabela 3). Nas glebas PP e SI-A, no entanto, que estavam com cobertura vegetal de pasto, observamos que em PP houve um número um pouco maior de bactérias e fungos (na florescência) que em SI-A (Tabela 2), e menor diversidade fenotípica que a encontrada em SI-A (Tabela 3).

TABELA 2: Contagem de bactérias e fungos heterotróficos totais.

Solos	Bactérias x10 ⁷ NMP g ⁻¹			Fungos x10 ⁴ UFC g ⁻¹		
	semeadura	florescência	colheita	semeadura	florescência	colheita
RN	0,14	0,46	1,70	1,80	1,50	8,00
PC	1,30	<u>13,0</u>	0,70	4,50	<u>14,0</u>	4,00
SI-A	0,17	1,30	3,30	2,30	5,00	5,50
SI-B	0,24	<u>24,0</u>	4,90	11,0	<u>55,0</u>	5,50
PP	0,92	4,90	3,30	5,50	18,0	5,50

RN= solo de Reserva natural, sem manejo agrícola; PC= plantio convencional; SI= Sistema integrado lavoura/pastagem; PP= pastagem permanente.

TABELA 3: Índice de diversidade fenotípica da florescência (1998)

Solos	%			Agrupamentos ^(a,b)	H' ^(c)
	Gram +	Gram -			
RN	55	45		6(1); 3(2); 1(3)	1,211
PC	27	73		7(1); 3(2); 2(4)	<u>1,590</u>
SI-A	27	73		3(1); 2(4)	0,765
SI-B	06	94		3(1); 3(2); 1(4)	<u>0,978</u>
PP	37	63		2(1); 2(2)	0,489

(a) Agrupamentos por biotipos foram feitos a partir aos isolados com identificação >90% no BIÓLOG (b) pi número em parênteses representa o nº de indivíduos de cada grupo (biotipo), e o número fora dos parênteses representa o nº de grupos. (c) índice de Shannon. RN= solo de Reserva natural; PC= plantio convencional; SI= Sistema integrado lavoura/pastagem; PP= pastagem permanente.

Diversidade genotípica bacteriana

Os dendogramas de similaridade permitiram avaliar pela presença e ausência de bandas, os microrganismos dominantes encontrados nos diferentes sistemas (Tabela 4 - I) e com a comparação dos padrões (intensidades) de cada banda, foi possível conjecturar quanto à dinâmica das populações dominantes de cada sistema, entre a semeadura e a florescência (Tabela 4 - II). O sistema natural (RN) apresentou a maior variação, isto é, o menor do padrão de similaridade da diversidade bacteriana (84%) entre os períodos estudados, este fenômeno

foi menos intenso para PP, SI-A e SI-B e praticamente inexistente em PC (Tabela 4 – I). Isto nos sugere que, em todos os sistemas agrícolas e de integração, não houve alteração na comunidade bacteriana (dominante) entre a semeadura e florescência. Entretanto alguns grupos dentre os dominantes devem ter aumentado ou diminuído de número, uma vez que o padrão de intensidade apresentou-se bem menos similar (Tabela 4 – II).

TABELA 4: Correlação genotípica entre a presença e ausência de bandas (I) e de Correlação genotípica entre as intensidades (II) das bandas no Gel de DGGE dos solos estudadas coletados nos períodos de semeadura (a) e florescência (b) do cultivo de inverno de 1998.

% Correlação Similaridade (a) e (b)	RN	PC	SI-A	SI-B	PP
I	84%	97,6%	93,3%	93,3%	88,9%
II	<60%	89%	79%	79%	75%

RN= solo de Reserva natural, sem manejo agrícola; PC= plantio convencional; SI= Sistema integrado lavoura/pastagem; PP= pastagem permanente.

CONCLUSÕES

A diversidade bacteriana (grupos dominantes) dos solos não foi alterada pelo manejo e nem pela época de crescimento da planta (semeadura e florescência), mas estes grupos, aparentemente, apresentaram uma dinâmica de seleção (quantitativa) entre os períodos estudados, e esta dinâmica foi influenciada pelo tipo de manejo agrícola, principalmente nos sistemas de plantio direto com integração.

BIBLIOGRAFIA

- AKKERMANS, A. D. L.; VAN ELSAS, J.D. & DE BRUIJN, F.J. *Molecular Microbial Ecology Manual*. 2.ed. The Netherlands, Kluwer Acad. Publs., 1995.
- GARLAND, J. L. & MILLS, L. Classification and characterization on heterotrophic microbial communities on basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57:2351-2359, 1991.
- GRIFFITHS, B. S.; RITZ, K.; WHEATLEY, R.; KUAN, H. L.; BOAG, B.; CHRISTENSEN, S.; EKELUND, F.; SORENSEN, S. J.; MULLER, S. & BLOEM, J. An examination of the biodiversity-ecosystem function relationship in arable soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.*, 33:1713-1722, 2001.
- HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K. & WELLINGTON, E.M.H. Analysis of Actinomycete Communities by Specific Amplification of Genes Encoding 16S rDNA and Gel-Electrophoretic Separation in Denaturing Gradients. *Appl. And Environ. Microbiol.*, 63:3233-3241, 1997.
- HEUER, H.; WIELAND, G.; SCHÖNFELD, J.; SCHÖNWÄLDER, A.; GOMES, N. C. M. & SMALLA, K. Bacterial community profiling using DGGE or TGGE analysis. In: *Environmental Molecular Microbiology: protocols and applications*. Horizon Scientific Press, Wymondham, U.K., 2001, p.177-190.
- MILLS, A. L. & WASSEL, R. A. Aspects of Diversity Measurement for Microbial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40:578-586, 1980.
- PAGE, A. L.; MILLER, R.H.; & KEENEY, D.R. *Methods of soil analysis - Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. 2.ed. Copyright ASA-SSSA. Madison, Wisconsin, USA, 1982.
- SALTON, J.C. Impacto ambiental de sistemas intensivos e integrados de produção de grãos e carne bovina, na região oeste do Brasil. In: *Workshop sobre sistemas sustentáveis de produção agropecuária*. EMBRAPA. Dourados, MS, 1996, p. 10-14.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. *Molecular Cloning*. In: *A Laboratory Manual*. 2.ed., Cold Spring Harbor Press, New York, USA, 1989.