

CAPÍTULO XV

PROTOZOÁRIOS

Jair Alves Dionísio
Ana Luiza Mattana
Diana Signor

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

PROTOCOLO XIII

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

1. Material

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

Tabela 19. Meio de cultivo Ágar Nutriente.

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

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

Caldo nutritivo

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

2. Metodologia

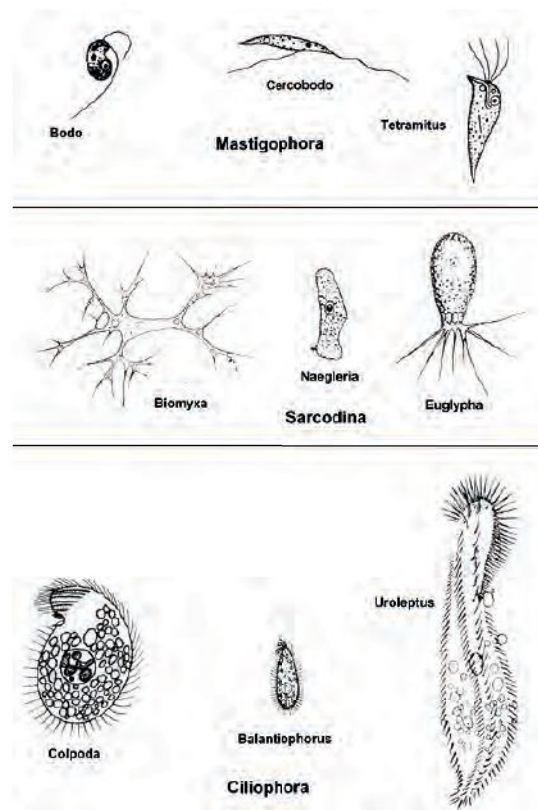
2.1. Cultivo bacteriano

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

2.2. Diluição e inoculação do solo

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

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



Fonte: Alexander (1980).

Figura 4. Classes de protozoários do solo.

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

3. Cálculo

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

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

4. Resultados

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

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

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