

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
DEPARTAMENTO DE SOLOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA O MONITORAMENTO DA  
QUALIDADE DO SOLO**

Doutoranda: Andressa de Oliveira Silveira  
Orientador: Prof. Dr. Flávio Anastácio de Oliveira Camargo

Porto Alegre  
Maio/2011



Dedicada a meus pais Arlete e Carlos,  
responsáveis pela pessoa que sou hoje,  
e ao meu eterno companheiro Anô.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo pela oportunidade da realização do curso.

Ao CNPq pela concessão de bolsas de estudo.

Ao meu orientador Flávio Camargo por sua orientação, paciência, compreensão e pelas inúmeras oportunidades oferecidas. O convívio com ele ao longo desses quatro anos me fez amadurecer como pessoa e pesquisadora.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo que de alguma maneira contribuíram para a minha formação.

As instituições de pesquisa e produtores rurais que me permitiram fazer as coletas de solo para a realização deste trabalho.

A Università di Firenze, professor Paolo Nannipieri, pela orientação e oportunidade impagável de trabalhar no seu grupo de pesquisa. Aos pesquisadores Giancarlo e Laura por dividirem seus ensinamentos e paciência.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Microbiologia do Solo pelos ótimos momentos de descontração que passamos juntos. Um agradecimento especial à minha grande amiga Patrícia, sempre disponível para ajudar ou simplesmente para conversar.

Ao meu eterno bolsista (hoje já estudante de mestrado!) Dione, tão importante na realização deste trabalho, meu braço direito durante essa jornada.

Às famílias Furtado, de Guaíba e de Porto Alegre, sempre presentes, nas horas boas e também nas não tão boas. Às minhas queridas amigas Raquel e Priscila que sempre me ajudaram, não importando a hora.

Minha querida prima Daniele, uma pessoa única e especial que foi imprescindível para a conclusão deste trabalho. Sem esquecer é claro do primo+ Manuel, sempre disposto a ajudar.

Aos meus pais, Arlete e Carlos, por estarem sempre presentes, acreditar e apoiar minhas decisões, e aos meus irmãos Larissa e Cícero pela paciência.

Ao meu marido Anô pelos abraços silenciosos nos momentos em que nada mais parecia funcionar; pela paciência, apoio incondicional, companheirismo e amor.

# AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA O MONITORAMENTO DA QUALIDADE DO SOLO <sup>1</sup>

Autor: Andressa de Oliveira Silveira

Orientador: Prof. Flávio Anastácio de Oliveira Camargo

## RESUMO

O uso de indicadores biológicos para avaliar alterações na qualidade solo tem sido proposto, pois estes atributos possuem sensibilidade de responder rapidamente às modificações que ocorrem no ambiente. O objetivo deste trabalho foi avaliar metodologias para o monitoramento da qualidade do solo através de indicadores biológicos. Na primeira parte do trabalho foram avaliados solos sob cultivo em três locais, onde foram coletadas amostras na profundidade de 0-10 cm de áreas sob vegetação nativa e áreas cultivadas em duas épocas do ano. A biomassa microbiana foi determinada usando os métodos da Fumigação-Incubação, Fumigação-Extração e Respiração Induzida por Substrato. Foi ainda avaliada a atividade microbiana do solo por meio da respiração basal, N-mineralizado, atividade da desidrogenase, hidrólise do diacetato de fluoresecina (DAF) e a diversidade funcional com a utilização de placas BiologECO. De maneira geral a biomassa, respiração e hidrólise DAF mostraram-se sensíveis em detectar diferenças entre as áreas, enquanto o N mineralizado e a atividade da desidrogenase foram mais variáveis, não apresentando diferença estatística entre algumas áreas avaliadas. A diversidade funcional, representada pelo índice de Shannon aplicada aos resultados do BiologECO, na maioria dos locais não apresentou diferença significativa entre as áreas avaliadas nas duas amostragens. A visualização das diferenças entre as áreas ficou mais evidente quando todos os atributos avaliados foram representados juntos em gráficos radiais e quando foi calculado um índice biológico de qualidade integrando todos eles. No segundo estudo foi desenvolvido um novo protocolo para extração do proteoma do solo. Foi utilizado um solo contaminado com altas concentrações de cobre e remediado pelas adições de matéria orgânica e calcário dolomítico. O protocolo desenvolvido foi relativamente eficiente para extrair as proteínas do solo e também da solução do solo. Após a separação das proteínas por eletroforese de gel bidimensional foi possível visualizar diferenças no perfil protéico entre os diferentes tratamentos avaliados, indicando o potencial da proteômica em estudos de monitoramento de áreas contaminadas, assim como para avaliar a eficácia de tratamentos de remediação. No entanto, para que esta técnica seja efetivamente utilizada em estudos de monitoramento é necessário um estudo correlacionando a concentração do metal com a quantidade e expressão de proteínas.

<sup>1</sup> Tese de doutorado em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. (84p) . 2011. Trabalho realizado com apoio financeiro do CNPq.

## EVALUATION OF METHODOLOGIES FOR MONITORING SOIL QUALITY<sup>1</sup>

Author: Andressa de Oliveira Silveira

Adviser: Prof. Flávio Anastácio de Oliveira Camargo

### **ABSTRACT**

The use of biological indicators to evaluate changes in soil quality has been proposed, because these attributes have sensitivity to respond quickly to changes occurring in the environment. The aim of this study was to evaluate methods for monitoring soil quality by biological indicators. In the first part of the study were evaluated in cropped soils under three locations. Samples were collected at depth of 0-10 cm areas under native vegetation and cultivated areas in two periods of the year. Microbial biomass was determined using the methods of fumigation-incubation, fumigation-extraction and substrate induced respiration. It was also evaluated the microbial activity of soil through respiration, mineralized-N, dehydrogenase activity, Fluorescein diacetate hydrolysis (FDA) and functional diversity with the use of BiologECO plates. In general the biomass, respiration and hydrolysis FDA were sensitive in detecting differences between areas, while the mineralized-N and dehydrogenase activity were more variable, with no significant difference between some areas evaluated. The functional diversity, represented by the Shannon index applied to the results of BiologECO, showed no significant difference between the areas assessed in two samples in most of the sites. The view of the differences between the areas became more evident when all attributes were represented together in radial graphs and when it was calculated an index of biological quality integrating them all. In the second study it was developed a new method for extraction of the proteome of the soil. It was used a soil contaminated with high concentrations of copper and remedied by additions of organic matter and lime. The protocol developed was relatively efficient way to extract the proteins from the soil and also soil solution. After separation of proteins by two-dimensional gel electrophoresis was possible to visualize differences in protein profiles between different treatments, indicating the potential of proteomics in studies monitoring of contaminated areas, as well as to evaluate the efficacy of treatments for remediation. However for this technique is effectively used in monitoring studies requires a study correlating the concentration of the metal with the quantity and protein expression.

<sup>1</sup> Doctoral thesis in Soil Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. (84p), 2011.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1. Sustentabilidade do solo e do ambiente.....	03
2.2. Qualidade do solo e do ambiente.....	05
2.3. Indicadores da qualidade do solo.....	06
2.4. Indicadores de qualidade biológica do solo.....	08
2.4.1 Biomassa microbiana.....	10
2.4.2 Atividade microbiana.....	11
2.4.3 Diversidade microbiana.....	13
2.5. Sistematização das informações e construção de índices de qualidade biológica do solo.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1. Seleção de Métodos para Avaliação da Qualidade Biológica do Solo.....	21
3.1.1 Áreas avaliadas.....	21
3.1.2 Avaliações da biomassa microbiana.....	22
3.1.2.1 Fumigação-Incubação.....	23
3.1.2.2 Fumigação-Extração.....	24
3.1.2.3 Respiração Induzida por Substrato.....	25
3.1.3 Avaliações da atividade microbiana.....	26
3.1.3.1. Respiração Basal.....	26
3.1.3.2 Hidrólise do Diacetato de Fluoresceína.....	27
3.1.3.3 Atividade da Desidrogenase.....	27
3.1.3.4 Mineralização do Nitrogênio.....	28
3.1.4 Avaliações da diversidade microbiana.....	28
3.1.4.1 BIOLOG.....	28
3.1.5 Análise estatística.....	30
3.2 Proteoma do solo e da solução do solo contaminado com cobre.....	30
3.2.1 Proteoma do solo.....	30



3.2.1.1 Seleção e descrição da área de estudo.....	30
3.2.1.2 Curvas de crescimento do microrganismo indicador.....	31
3.2.1.3 Viabilidade do microrganismo indicador em contato com o solo.....	33
3.2.1.4 Preparação das amostras para extração do proteoma.....	33
3.2.1.5 Extração, purificação e quantificação das proteínas do solo.....	34
3.2.1.6 Análise das proteínas.....	35
3.2.1.7. Identificação das proteínas por espectrometria de massa.....	38
3.2.2. Proteoma da solução do solo.....	38
3.3.2.1 Descrição da área experimental.....	38
3.3.2.2 Contagem de microrganismos cultiváveis na solução do solo.....	39
3.3.2.3 Extração, purificação, separação e análise das proteínas.....	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1 Seleção de Métodos para Avaliação da Qualidade Biológica do Solo.....	41
4.1.1. Comparação de métodos para avaliação da biomassa microbiana do solo.....	41
4.1.2. Atributos biológicos de solos sob diferentes usos.....	45
4.1.3. Representação integrativa dos atributos biológicos do solo.....	54
4.2. Proteoma do solo e da solução do solo contaminado com cobre	61
4.2.1. Proteoma do Solo.....	61
4.2.1.1. Curvas de crescimento do <i>C. metallidurans</i> CH34.....	61
4.2.1.2. Viabilidade do <i>C. metallidurans</i> CH34 no solo.....	62
4.2.1.3. Extração do proteoma do solo.....	63
4.2.1.4. Separação das proteínas.....	65
4.2.2. Proteoma da Solução do Solo.....	67
5. CONCLUSÕES.....	74
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
7. APÊNDICES.....	83

## RELAÇÃO DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	Coluna de polivivipirrolidona (PVP).....	35
<b>Figura 2:</b>	Sistema Ettan™ IPGphor™ (GE Healthcare) para separação de proteínas em função do seu ponto isoelétrico .....	36
<b>Figura 3:</b>	Sistema Protean Multi Cell XL (Bio-Rad) para separação de proteínas em função da sua dimensão.....	37
<b>Figura 4:</b>	Relação entre valores do carbono da biomassa microbiana (mg C-CO <sub>2</sub> Kg <sup>-1</sup> solo seco ) obtidos pelo método da Fumigação-Incubação e Fumigação-Extração em solos de diferentes locais sob diferentes coberturas, amostrados em julho/2009 .....	43
<b>Figura 5:</b>	Relação entre valores do carbono da biomassa microbiana (mg C-CO <sub>2</sub> Kg <sup>-1</sup> solo seco) obtidos pelo método da Fumigação-Incubação e Respiração Induzida por Substrato em solos de diferentes locais sob diferentes coberturas amostrados em janeiro/2009.....	44
<b>Figura 6:</b>	Gráfico de ordenação após a Análise de Componentes principais dos atributos biológicos de Latossolo Vermelho distroférico sob mata nativa, cana-de-açúcar, plantio direto soja/trigo (PD) e plantio convencional soja/trigo (PC).....	51
<b>Figura 7:</b>	Gráfico de ordenação após a Análise de Componentes principais dos atributos biológicos de Latossolo Vermelho distroférico sob cana-de-açúcar, plantio direto soja/trigo (PD) e plantio convencional soja/trigo (PC).....	52
<b>Figura 8:</b>	Representação integrativa (%) dos atributos biológicos de Latossolo Vermelho distrófico, sob lavoura de soja e mata nativa como referência, da profundidade de 0-10cm, em duas épocas de amostragem: verão (acima) e inverno (abaixo), no município de Tio Hugo.....	56
<b>Figura 9:</b>	Representação interativa (%) dos atributos biológicos de Argissolo Vermelho distrófico típico, sob campo nativo e eucalipto como referência, da profundidade de 0-10cm, em duas épocas de amostragem: verão (acima) e inverno (abaixo).....	57
<b>Figura 10:</b>	Representação interativa (%) dos atributos biológicos de Latossolo Vermelho distroférico sob mata nativa, cana de açúcar, plantio direto e plantio convencional, da profundidade de 0-10cm, em duas épocas de amostragem: verão (acima) e inverno (abaixo)	58
<b>Figura 11:</b>	Curvas de crescimento de <i>C. metallidurans</i> CH34 em meio mineral com e sem adição de cobre	61
<b>Figura 12:</b>	Géis bidimensionais de proteínas extraídas de <i>C.metalludurans</i> CH34 (a) e <i>C.metalludurans</i> CH34 + Cu (b).....	66

<b>Figura 13:</b> Géis bidimensionais de proteínas extraídas de solo sem tratamento + <i>C.metalludurans</i> CH34 (a) e solo com tratamento + <i>C.metalludurans</i> CH34 (b).....	66
<b>Figura 14:</b> Géis bidimensionais de proteínas extraídas da solução do solo sem tratamento e sem plantas (a), sem tratamento e com plantas (b), com adição de calcário (c), com adição de composto orgânico (d) e com adição de composto orgânico e calcário (e)...	70

## RELAÇÃO DE TABELAS

<b>Tabela 01:</b>	Fontes de carbono contidas nas microplacas Biolog.....	29
<b>Tabela 02:</b>	Características físico-químicas das amostras de solução do solo.....	39
<b>Tabela 03:</b>	Carbono da Biomassa Microbiana determinado por três diferentes metodologias em amostras de solo de diferentes locais sob diferentes usos.....	42
<b>Tabela 04:</b>	Coeficientes de correlação (r) entre métodos para determinação do carbono da biomassa microbiana em amostras de solo de diferentes locais sob diferentes coberturas em duas épocas de amostragem.....	44
<b>Tabela 05:</b>	Atributos biológicos de Argissolo Vermelho distrófico sob campo nativo e eucalipto, na camada de 0-10cm, no município de Eldorado do Sul (RS), em amostras coletadas em janeiro de 2009.....	45
<b>Tabela 06:</b>	Atributos biológicos de Argissolo Vermelho distrófico sob campo nativo e eucalipto, na camada de 0-10cm, no município de Eldorado do Sul (RS), em amostras coletadas em julho de 2009.....	46
<b>Tabela 07:</b>	Atributos biológicos de Latossolo Vermelho distrófico sob mata nativa e plantio direto soja/trigo, na camada de 0-10cm, no município de Tio Hugo (RS), em amostras coletadas em janeiro de 2009.....	47
<b>Tabela 08:</b>	Atributos biológicos de Latossolo Vermelho distrófico sob mata nativa e plantio direto soja/trigo, na camada de 0-10cm, no município de Tio Hugo (RS), em amostras coletadas em julho de 2009.....	48
<b>Tabela 09:</b>	Atributos biológicos de Latossolo Vermelho distroférico sob mata nativa e cana de açúcar, na camada de 0-10cm, no município de Londrina (PR), em amostras de solo coletadas em janeiro de 2009.....	49
<b>Tabela 10:</b>	Atributos biológicos de Latossolo Vermelho distroférico sob mata nativa, cana de açúcar, plantio direto soja/trigo e plantio convencional, na camada de 0-10cm, no município de Londrina (PR), em amostras de solo coletadas em julho de 2009.....	49

<b>Tabela 11:</b>	Atributos biológicos de Latossolo Vermelho distroférico sob cana de açúcar, plantio direto soja/trigo e plantio convencional soja/trigo, na camada de 0-10cm, no município de Londrina (PR), em amostras de solo coletadas em julho de 2009.....	50
<b>Tabela 12:</b>	Índice de Qualidade Biológica de solos sob diferentes usos, em duas épocas do ano.....	59
<b>Tabela 13:</b>	Número de unidades formadoras de colônia por grama de solo com e sem tratamento de remediação e com e sem adição de <i>C. metallidurans</i> CH34 com diferentes tempos de incubação....	62
<b>Tabela 14:</b>	Número de unidades formadoras de colônia em 1ml de solução coletada de solos contaminados com cobre com e sem tratamento de remediação.....	68
<b>Tabela 15:</b>	Concentração de proteínas ( $\mu\text{g}$ ) em 100 ml de solução coletada de solos contaminados com cobre com e sem tratamento de remediação.....	69
<b>Tabela 16:</b>	Quantidade de pontos protéicos observados em géis bidimensionais obtidos de amostras de solução de solos sob diferentes condições.....	69
<b>Tabela 17:</b>	Porcentagem de volume dos pontos protéicos que apresentaram diferença estatística em amostras de solução de solo contaminado com cobre sob diferentes tratamentos de remediação.....	72

## RELAÇÃO DE APÊNDICES

<b>Apêndice 01</b>	Umidade gravimétrica (%) de amostras em solo sob diferentes usos coletadas nos municípios de Tio Hugo (RS), Eldorado do Sul (RS) e Londrina (PR) em duas épocas de amostragem.....	83
<b>Apêndice 02</b>	Resultados relativos (%) dos atributos biológicos de Latossolo Vermelho distrófico sob mata nativa e plantio direto soja/trigo, na camada de 0-10cm, no município de Tio Hugo (RS), em amostras coletadas em janeiro de 2009 (1ºamostragem) e julho de 2009 (2ºamostragem).	83
<b>Apêndice 03</b>	Resultados relativos (%) dos atributos biológicos de Argissolo sob campo nativo e eucalipto, na camada de 0-10cm, no município de Eldorado do Sul (RS), em amostras coletadas em janeiro de 2009 (1ºamostragem) e julho de 2009 (2ºamostragem).....	84
<b>Apêndice 04</b>	Resultados relativos (%) dos atributos biológicos de Latossolo Vermelho distroférico sob mata nativa e cana de açúcar, na camada de 0-10cm, no município de Londrina (PR), em amostras de solo coletadas em janeiro de 2009 (1ºamostragem) e julho de 2009 (2ºamostragem).....	84



## 1. INTRODUÇÃO

A expansão demográfica e o consumo de recursos não renováveis têm levado a degradação ambiental e a insustentabilidade dos ecossistemas no país. Associado a esta constatação, verifica-se a inexistência de mecanismos de monitoramento que façam um diagnóstico preciso e confiável desta degradação, bem como a previsão de impactos que afetam a sustentabilidade do ambiente. Apesar do interesse pelo meio científico e político, os conceitos de sustentabilidade e de degradação do ambiente permanecem vagos.

A padronização destes conceitos e o desenvolvimento de medidas quantitativas de avaliação são essenciais para a que fatos subjetivos e abstratos se transformem em fatos científicos e aplicáveis a resolução dos problemas reais de sustentabilidade do ambiente. Como situação específica de potenciais impactos no ecossistema e a necessidade de monitoramento destacam-se a contaminação ambiental do solo, da água e da atmosfera por poluentes orgânicos e inorgânicos e a perda da capacidade produtiva do solo devido à utilização inadequada e intensiva de insumos, espécies exóticas, monocultivos, mecanização, entre outros.

A qualidade do solo como um importante indicador da sustentabilidade de agroecossistemas, tem seu monitoramento feito a partir do comportamento de indicadores, ao longo do tempo, ou comparando seus desempenhos com valores de referência, que podem ser estabelecidos a partir de resultados de pesquisa ou obtidos em ecossistemas naturais, localizados nas mesmas condições do solo avaliado.

O uso de indicadores biológicos para monitorar alterações no solo e avaliar a sua qualidade tem sido sugerido e adotado em alguns países em



programas de monitoramento. Os microrganismos desempenham papel chave em diversos processos do solo, como a degradação na matéria orgânica e ciclagem de nutrientes, degradação de resíduos tóxicos e contaminantes e na promoção de crescimento de plantas. Por serem extremamente dinâmicos os atributos biológicos, possuem sensibilidade de responder rapidamente às modificações que ocorrem no ambiente do solo, sejam elas químicas ou físicas.

Muitas são as metodologias que podem ser empregadas para avaliar a microbiota do solo, seja através da quantificação da sua população, como a determinação do carbono da biomassa microbiana, ou através da medida da sua atividade, como a respiração basal, atividades enzimáticas e mineralização do nitrogênio. A avaliação conjunta destes parâmetros e a agregação destas mensurações na forma de um índice podem ser úteis para avaliar o estado de degradação do solo, sendo que quanto menores os valores da biomassa, atividade e diversidade microbiana, mais degradado se encontra o solo. Com base na hipótese apresentada acima o objetivo deste trabalho é avaliar e desenvolver metodologias para o monitoramento da qualidade do solo através de indicadores biológicos.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Sustentabilidade do solo e do ambiente**

O aumento exponencial da população brasileira e a capacidade finita dos nossos recursos são hoje reconhecidos como o principal problema para manter a segurança alimentar e a qualidade de vida para as próximas gerações (UNCED, 1992). Como reflexo desta demanda, têm se observado a degradação de recursos como o solo e o crescente aumento da poluição ambiental, comprometendo a sustentabilidade dos ecossistemas e a economia do país. Esta degradação é conseqüência da utilização inadequada destes recursos, desconhecimento da aptidão e da capacidade de uso do solo, desconsideração das limitações e fragilidades do ambiente e inabilidade para prever e monitorar o avanço da degradação e da perda da sustentabilidade.

Como conseqüência direta, o ambiente perde suas propriedades de produção, sua capacidade de resistir aos impactos e estresses abióticos, e em ultima análise, sua sustentabilidade, quando perde as qualidades inerentes de um sistema capaz de manter sua estrutura sem comprometer a demanda da população por alimentos e bens de consumo. Este conceito teórico de sustentabilidade é útil e relevante, mas necessita ser objetivo, quantificado e confiável para monitorar e orientar a tomada de decisão a respeito das estratégias a serem adotadas para manter o ambiente na condição de sustentável.

As tentativas de avaliação da sustentabilidade dos ecossistemas têm sido falhas devido à falta de foco, indefinição de objetivos múltiplos e/ou específicos, grandes variações na escala de tempo e de espaço e falta de

critérios e de padronização na avaliação. Além disso, a necessidade de produção de alimentos deve ser compatível com altos padrões de qualidade ambiental. Neste caso, atingir elevadas produtividades ao mesmo tempo em que mantém e melhora a qualidade do ambiente não devem ser características dissociáveis no ambiente. Assim, o grande objetivo é quantificar a sustentabilidade e avaliar o impacto no manejo das propriedades do solo e de processos relevantes para a produção agrônômica e a qualidade ambiental. Isto implica que o uso do solo e o sistema de manejo adotado podem ser avaliados de acordo com a aptidão da terra, baseando-se para isso em conhecimento prévio dos recursos naturais existentes (Lal, 1994).

Deste modo, as principais metas a serem alcançadas com a avaliação da sustentabilidade do solo podem ser resumidas como: a) conservar e melhorar os recursos naturais renováveis; b) caracterizar e quantificar os principais processos de degradação; c) identificar as características de resiliência e de recuperação do solo; d) identificar as possibilidades de manejo e de gerenciamento em compatibilidade com o potencial e limitação dos recursos; e) avaliar a magnitude e a tendência das alterações nas propriedades e processos que ocorrem no solo sob diferentes sistemas de manejo; f) propor políticas que estimulem a busca do uso sustentável dos recursos (Bloem et al., 2006).

De acordo com Lal (1994) existe uma seqüência de passos que são necessários para avaliar o uso sustentável do solo. O primeiro passo consiste na definição dos objetivos da avaliação, seguido do passo seguinte que é prospecção detalhada das capacidades e limitações dos recursos e identificação dos processos predominantes de degradação do solo. O terceiro passo é avaliar as alterações nos indicadores do solo provocadas pelo uso agrícola e não agrícola. Se a produtividade diminui ou os indicadores de solos são alterados drasticamente, o próximo passo é readequar o sistema de manejo e de uso do solo e reavaliar as mudanças em relação à recuperação da capacidade produtiva e da qualidade ambiental.

## 2.2 Qualidade do solo e do ambiente

A sustentabilidade de um ecossistema é dependente em grande parte da qualidade do ambiente e do solo e, conseqüentemente, da saúde de plantas, animais e humanos. A qualidade ambiental é resultante de um conjunto de propriedades desejáveis que o solo, água e atmosfera devem possuir. Nesta situação, o solo desempenha papel primordial, pois é o ambiente mais complexo, apresentando-se como uma mistura de componentes vivos e não vivos interagindo entre si e variando, naturalmente, no tempo e no espaço. Definir qualidade do solo ocorre tentativamente pela escolha de algum indicador químico, físico ou biológico que representam algum constituinte, processo ou condição particular em diferentes níveis de aproximação (Schloter et al., 2006).

Do ponto de vista operacional, o conceito de qualidade do solo é definido por propriedades e atributos mensuráveis que irão caracterizar esta qualidade e proporcionar um índice quantitativo que pode ser medido. Para isso, é necessário que as funções do solo no ecossistema sejam compreendidas de uma forma mais abrangente do que somente a produção vegetal. Numa visão mais ampla, o solo é responsável pelo fluxo da água no ciclo hidrológico, pelo controle das emissões dos gases do efeito estufa, pela atenuação, tamponamento e remediação de contaminantes xenobióticos e pelo controle da qualidade da água e do ar (Burns et al, 2006).

Herrick (2000) afirmou que a qualidade do solo pode ser o indicador ideal do manejo sustentável do ambiente uma vez que podem incluir na sua definição: a) existência de relação causal entre qualidade do solo e funções do ecossistema, como a conservação da biodiversidade, produção de biomassa e conservação do solo; b) capacidade dos indicadores da qualidade do solo para prever as respostas a impactos no ambiente; c) maior resposta e acessibilidade ao monitoramento; d) maior integração com outros indicadores bio-físicos e sócio-econômicos; e) amplitude do conceito da qualidade do solo no contexto da paisagem e do ambiente.

### **2.3 Indicadores da qualidade do solo**

Avaliação ambiental sistêmica demanda indicadores de primeira geração, de segunda geração e de terceira geração, como definidos a seguir. Por definição, indicadores de primeira geração são aqueles que o observador vê o problema e o sistema que o manifesta, e procura entendê-los. O problema, assim como o sistema, está lá fora. Exemplos destes indicadores são indicadores físico-químicos e biológicos do solo sujeito à contaminação. Indicadores de segunda geração são aqueles quando o olhar que quer compreender o problema é sistêmico. O sistema é produto do pensar as relações de interesse, e quem pensa se percebe parte do problema. Exemplos destes indicadores são as tentativas de integração sistêmica como o índice de qualidade do solo, o método integrativo de avaliação da qualidade do solo, entre outros. Mais recentemente está sendo proposto o uso de indicadores de terceira geração, cuja característica é a de que o avaliador se avalia em como avalia sistemicamente o problema . condição para a passagem do eu para o nós. Esta tentativa é inovadora e até o momento ainda sem definição apropriada.

Antes de tratar o sistema de avaliação como um todo é necessário inicialmente definir os critérios e selecionar indicadores para a avaliação quantitativa do uso sustentável do solo. Os passos para esta fase são os seguintes: a) identificar indicadores de sustentabilidade do solo; b) estabelecer relações quantitativas entre estes indicadores e os processos de degradação do solo; c) definir limites críticos para os indicadores em relação a valores de referência onde o solo é degradado irreversivelmente; d) estabelecer índices (conjunto de indicadores) de sustentabilidade e de qualidade do solo; e) selecionar métodos de rotina para avaliar os indicadores da qualidade do solo; f) estabelecer um banco de dados para diferentes solos, manejos e impactos decorrentes da atividade agrícola e não-agrícola; g) desenvolver ferramentas que sistematizem as informações geradas em diferentes ecossistemas e escalas de monitoramento que forneçam subsídios para a previsão e mitigação de impactos decorrentes do uso do solo.

Em relação à definição conceitual de indicadores de sustentabilidade existem três termos sugeridos pela OECD (1999) que merecem esclarecimentos: a) parâmetros (uma propriedade que pode ser medida ou observada); b) indicador (um valor derivado de parâmetros o qual indica, informa ou descreve o significado de um estado ou condição além do valor apontado pelo parâmetro); c) índice (conjunto de indicadores ou de parâmetros). O critério para a escolha de um indicador de qualidade do solo deve levar em consideração: a) sua utilidade em definir processos do ecossistema; b) sua habilidade em integrar propriedades químicas, físicas e biológicas; c) sua sensibilidade para detectar variações no manejo e no clima (Doran, 2000). Na definição de um indicador, devem-se considerar também alguns aspectos como: a) simplicidade e facilidade de medição; b) aplicabilidade em todas as escalas; c) capacidade de predição e extrapolação; d) versatilidade; e) simplicidade de análise e de interpretação; f) relevância ecológica; g) adequação e direcionado a processos e condições de avaliação (Lal, 1994).

Depois de identificados os indicadores de sustentabilidade do solo é preciso estabelecer relações quantitativas destes indicadores com os processos de degradação destes recursos. Com estas relações bem definidas é possível calibrar os indicadores com eventos específicos de degradação ambiental e estabelecer níveis críticos de sustentabilidade que irão nortear a tomada de decisão durante a avaliação e monitoramento do ecossistema. Uma vez obtidos um número mínimo de dados e a relação com a perda de sustentabilidade é necessário interpretar a informação em termos de potencialidades e limitações dos recursos.

O conhecimento dos valores extremos acima ou abaixo dos quais o solo é degradado irreversivelmente é entendido como o nível crítico de um indicador. O nível crítico pode ser definido em termos de diminuição da capacidade de produção agrícola ou de outra função econômica ou ambiental do solo. Deste modo, é extremamente importante adotar critérios adequados para estabelecer os níveis críticos dos indicadores de qualidade do solo, pois todo monitoramento e tomada de decisão será baseado nestes valores. Além

disso, é necessário considerar na definição de níveis críticos, os valores de referência de ambientes não impactados como forma de comparação e de expectativa de recuperação das propriedades originais.

Com a obtenção de dados e informações a respeito dos níveis críticos de indicadores de qualidade do solo, estes deverão ser combinados na forma de índices (conjunto de indicadores) ou de grupos de índices para então de forma mais consistente e abrangente avaliar o uso sustentado do ambiente. As principais possibilidades de desenvolvimento de índices de qualidade do solo estão baseadas na utilização de métodos paramétricos e não paramétricos de estatística e geoestatística, correlação, regressão, modelagem, etc. O primeiro índice de qualidade do solo foi proposto em 1992 (Lal, 1994) e até o momento existe quase uma dezena destes. Os mais elaborados e utilizados em situações reais são os conceitos biológicos de classificação e avaliação do solo desenvolvidos pela Alemanha (BBSK) e pela Holanda (BISQ).

#### **2.4 Indicadores de qualidade biológica do solo**

O conceito de classificação biológica do solo (BBSK) proposto e adotado pela Alemanha relaciona estrutura e função da comunidade microbiana e zoologia do solo. Neste conceito, a ocorrência de organismos do solo é determinada pelas características do solo e do local, resultando numa classificação do ecótipo. A partir da comparação entre uma comunidade esperada e uma obtida pode-se avaliar a função desta comunidade no habitat. Apesar das tentativas de aplicação deste índice, inúmeros autores (Breure et al, 2005) citam as limitações desta proposta. Entre as limitações: a) o baixo número de locais e de parâmetros necessários para definir o ecossistema; b) ausência de valores de referência de locais nunca impactados; c) falta de padronização dos métodos para a estimativa da comunidade; d) impossibilidade de organização dos dados de forma a transmitir conclusões e recomendações para o monitoramento.

O indicador biológico de qualidade do solo (BISQ) desenvolvido pela Holanda é mais razoável que o indicador Alemão em termos conceituais. A racionalidade está no fato de que o uso sustentável do solo pode ser avaliado

por um indicador ecológico de qualidade do solo, que integra dados das características químicas, físicas e biológicas do solo. A combinação de medições da parte biótica e abiótica no mesmo programa de monitoramento pode produzir modelos de resposta induzida para indicadores individuais. Com o modelo obtido a partir de um grande banco de dados é possível prever os efeitos da atividade humana no ambiente. Como ponto de partida para o estabelecimento de indicadores está a capacidade de suporte à vida (decompositores, recicladores, estruturação do solo e estabilidade do ecossistema), os processos (fragmentação, transformação, mineralização, atividade enzimática, absorção de nutrientes, bioturbação, agregação, cadeia trófica, etc.), os índices (variável indicativa) e os indicadores derivados desta análise (métodos rotineiros descritos na literatura).

Indubitavelmente a proposta holandesa é muito superior à alemã, mas ambas não são suficientes para fornecer ferramentas adequadas para interpretar, analisar, prever, diagnosticar e estabelecer estratégias de recuperação das propriedades iniciais dos ecossistemas. Em ambos os casos constata-se: a) a necessidade premente de construção de um banco de dados de referência contendo solos de diferentes características; b) a insuficiência de solos e de locais de referência, que não são representativos em relação as suas características biológicas e não biológicas; c) a desconsideração da variação temporal da comunidade, o que dificulta o estabelecimento de níveis críticos e a padronização de métodos; d) a inexistência, na Europa, de solos ou ambientes de referência nunca afetados pela atividade humana, dificultando a interpretação do efeito do uso do solo na comunidade biótica do solo; e) a impossibilidade de ordenamento e organização adequada dos dados obtidos estatisticamente, dificultando a avaliação da ocorrência de organismos no solo; f) o problema da visualização e interpretação de resultados complexos (Breure et al., 2005).

As duas propostas são unânimes que o componente biológico do solo possui maior sensibilidade em responder rapidamente às modificações que ocorrem no ambiente. Segundo Kennedy & Papendick (1995) os atributos biológicos se ajustam à maioria dos critérios para seleção de indicadores de



qualidade do solo. Isto se deve, principalmente, a sua capacidade de responder rapidamente a distúrbios causados pela ação antrópica, como alterações no manejo agrícola e adição de resíduos no solo.

Quando se deseja avaliar a qualidade biológica do solo três aspectos relacionados à porção viva do solo devem ser considerados: a) biomassa microbiana; b) atividade microbiana; c) diversidade microbiana.

#### 2.4.1 Biomassa microbiana

A biomassa microbiana (BM) é considerada a parte viva da matéria orgânica do solo, representando de 2 a 5% (Jenkinson & Ladd, 1981) desta fração do solo, e inclui bactérias, actinomicetos, fungos, protozoários, algas e microfauna. Mesmo representando uma pequena porção da matéria orgânica, a BM pode ser considerada uma fonte potencial de N, P, S e outros nutrientes para as plantas (De-Polli & Guerra, 1999). Segundo Smith & Paul (1990) a biomassa é um importante reservatório de nutrientes para as plantas no solo, pois está constantemente se reciclando. O estudo da BM é fundamental para a compreensão dos processos em que atua, assim como para o monitoramento de alterações nestes processos, principalmente aquelas causadas por ações antrópicas.

A BM pode ser medida por diferentes métodos, e os mais utilizados são os métodos da Fumigação-Incubação (Jenkinson & Powlson, 1976), Fumigação-Extração (Vance et al., 1987) e Respiração Induzida por Substrato (Anderson & Domsch, 1978). Os dois primeiros métodos baseiam-se na fumigação do solo com clorofórmio para matar toda população de microrganismos, sem afetar, contudo, o conteúdo dessa matéria orgânica morta. A diferença é que, no método da fumigação-incubação, o carbono é determinado na forma de CO<sub>2</sub> liberado pelo solo durante um período de incubação, sendo resultado da respiração decorrente do crescimento de organismos, usando como substrato os organismos mortos pela fumigação. Enquanto que, no método de incubação-extração, o carbono é determinado por extração com K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, oxidação e digestão química. Já a Respiração Induzida por Substrato é quando um substrato é adicionado ao solo em uma

concentração de saturação e é utilizado pelos microrganismos. O aumento da evolução de CO<sub>2</sub> nas primeiras horas antes de ocorrer uma resposta de crescimento, comparado a um solo sem substrato é uma medida da biomassa microbiana.

Muitos são os trabalhos relacionando diferentes impactos com a biomassa microbiana, como o efeito das práticas de cultivo e manejo (Matsuoka, 2006; Benintende et al., 2008), o uso de corretivos de acidez e fertilizantes (Masto et al., 2006), o uso de herbicidas (Perucci et al., 2000) e contaminação com metais pesados (Knight et al., 1997; Andrade & Silveira, 2004; Frey et al., 2006).

Apesar da BM do solo ser uma medida da população viva do solo, e conseqüentemente uma característica muito dinâmica, é pouco informativa quando apresentada isoladamente (Moreira & Siqueira, 2006). Segundo Mac Donald (1986) apenas de 15 a 30% da população é catabolicamente ativa no solo, o restante se encontra na forma inativa ou latente. Por isso é importante a avaliação conjunta da atividade microbiana do solo.

#### 2.4.2 Atividade microbiana

A atividade microbiana representa todas as reações bioquímicas catalisadas pela biomassa do solo. A medição da atividade microbiana no solo é baseada na presença de células microbianas intactas e ativas no solo, refletindo o estado fisiológico das células microbianas. As reações catabolizadas pelos microrganismos são de extrema importância para a manutenção da qualidade do solo. Além de papel chave nos ciclos biogeoquímicos, os microrganismos podem degradar substâncias tóxicas, controlar patógenos no solo, contribuir para a estruturação do solo, entre outras funções.

Existem várias metodologias empregadas para avaliar a atividade microbiana do solo, e os mais utilizados são: Respiração Basal (Stotzky, 1972), N mineralizado (Bundy e Meisinger, 1994) e avaliações de atividade enzimática como hidrólise do diacetato de fluoresceína (Adam & Duncam, 2001),

desidrogenase (Alef, 1998) e enzimas relacionadas aos ciclos biogeoquímicos como  $\alpha$ -glucosidase, fosfatase ácida e urease (Dick et al., 1996).

A respiração basal é um dos mais antigos parâmetros para quantificar a atividade microbiana. Ela representa a oxidação da matéria orgânica do solo por organismos aeróbios, ou seja, que utilizam  $O_2$  como acceptor final de elétrons e liberam  $CO_2$  (Anderson, 1982). A respiração microbiana pode ser mensurada no campo, sob condições naturais, ou em laboratório. A determinação da respiração microbiana no laboratório pode ser feita através da medida do  $O_2$  consumido ou do  $CO_2$  liberado do solo. A mais utilizada é pela determinação do  $CO_2$  liberado, podendo esta medida ser feita através de titulação (quando capturado por NaOH ou KOH), cromatografia gasosa, espectroscopia de infravermelho ou por  $^{14}C$ . Pode-se medir a respiração basal das amostras (ação dos microrganismos sobre a matéria orgânica presente na amostra) ou com indução por substrato (com adição de uma fonte de carbono).

O processo de mineralização do nitrogênio no solo pode ser definido como a conversão de N orgânico em forma mineral utilizável pelas plantas, no qual ocorre através da transformação bioquímica do N mediada por microrganismos (Stevenson, 1985). O possível uso da mineralização do N no solo como um índice de qualidade do solo é relevante por causa da relação deste processo com a capacidade do solo de fornecer N para o crescimento das plantas, e também por causa do risco da poluição atmosférica e aquática por este elemento (Canali e Benedetti, 2006).

Outra maneira de medir a atividade dos microrganismos é através da atividade enzimática. A hidrólise do diacetato de fluoresceína tem sido utilizada para esta finalidade, pois este substrato pode ser hidrolisado por diferentes enzimas liberadas pelos microrganismos no solo, como lipases, proteases e esterases, refletindo, portanto a atividade dos organismos heterotróficos do solo. Swisher & Carroll (1980) demonstraram que a quantidade de fluoresceína produzida pela hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA) era proporcional à população microbiana. Em 2001, Adam & Duncan desenvolveram uma

metodologia que possibilitou a utilização da hidrólise de FDA como indicador da atividade total de microrganismos heterotróficos do solo.

Já a desidrogenase existe como uma parte integral das células intactas e representa a atividade oxidativa total dos microrganismos do solo, durante os estágios iniciais da degradação da matéria orgânica (Dick, 1997). A desidrogenase tem sido utilizada como um parâmetro em estudos comparativos ecotoxicológicos (Gong et al., 1999; Welp, 1999; Moreno et al., 2001).

Vários trabalhos relacionam o efeito de impactos no solo sobre atividade dos microrganismos, como o efeito do uso intensivo do solo (Zhang et al., 2006), do manejo (Schmitz, 2003; Matsuoka, 2006; Mijangos et al., 2006), da contaminação por hidrocarbonetos (Gianfreda et al., 2005; Riffaldi et al., 2006) e da contaminação por metais pesados (Tobor-Kaplon et al., 2005; Frey et al, 2006; Tischer et al., 2008).

#### 2.4.3 Diversidade microbiana

Os microrganismos apresentam uma imensa diversidade genética e desempenham funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas, como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos. O conhecimento da diversidade microbiana inclui, entre outros, uma melhor compreensão das funções exercidas pelas comunidades microbianas no solo e a otimização da capacidade microbiana para a fertilização dos solos, e as interações com outros componentes da biodiversidade. A diversidade e atividade dos microrganismos presentes num sistema são extremamente dinâmicas, pois respondem rapidamente a mudanças no ambiente e são capazes de adaptar-se rapidamente a novas situações. Sua avaliação, portanto pode fornecer indicadores importantes para obter-se então o estado de qualidade atingido pelo solo sob um determinado tipo de manejo.

Várias estratégias têm sido utilizadas para estudar a diversidade e a estrutura das comunidades microbianas no solo, sendo que a maioria das abordagens é baseada em técnicas de biologia molecular. Mas o uso dessas metodologias baseadas na biologia molecular apenas permite avaliar o

potencial genético dos microrganismos no solo, não o nível de expressão deste potencial. Técnicas que envolvem amplificação por PCR e o seqüenciamento de regiões do DNA fornecem informações sobre a presença de microrganismos no ecossistema, mas não fornecem informações sobre a sua atividade. Essas ferramentas pouco informam sobre os processos bioquímicos do solo, por isso é necessário também considerar a diversidade funcional do solo.

Uma técnica simples que tem sido utilizada na avaliação da diversidade metabólica do solo é a que utiliza microplacas chamadas BIOLOG-Eco (Biolog Inc., Hayward, Califórnia). Esta técnica avalia a capacidade de utilização de diferentes fontes de carbono presentes nestas placas pela comunidade microbiana do solo (Derry et al., 1998). Vários autores (Sharma et al., 1998; Derry et al., 1998; Yan et al., 2000; Gómez et al., 2004; Mungai et al., 2005; Yao et al., 2000; Li et al., 2007; Ros et al., 2008) têm optado por utilizar esta técnica em conjunto com avaliações genéticas das comunidades.

Mas esta técnica apresenta algumas limitações, pois considera apenas microrganismos cultiváveis, ou seja, capazes de crescer em condições experimentais, é sensível a quantidade de inóculo, e assim como as técnicas de biologia molecular reflete apenas o potencial, não a diversidade funcional *in situ*. Por isso uma nova abordagem da comunidade microbiana está se mostrando promissora para o entendimento dos processos microbianos no solo: a proteômica.

Por proteoma entende-se o conjunto de todas as proteínas de um sistema biológico (Nannipieri, 2006). O estudo do proteoma de comunidades microbianas do solo permite a obtenção de informações mais realistas a respeito das funções destas comunidades nesse sistema, isso porque as proteínas exercem papéis essenciais em praticamente todos os processos biológicos, como a ciclagem de nutrientes. Além disso, esse tipo de avaliação é realizado *in situ*, refletindo o estado atual da comunidade microbiana do solo, não apenas o seu potencial.

Existem vários estudos envolvendo o proteoma de culturas microbianas puras, mas o uso desse tipo de avaliação em ambientes

complexos como o solo é recente, havendo, portanto poucos trabalhos publicados. Essa carência de estudos em amostras ambientais se deve às dificuldades na extração e separação destas proteínas de amostras tão complexas e a identificação das inúmeras moléculas obtidas. E quando se considera um sistema como o solo essa dificuldade é maior devido à complexa interação entre a comunidade microbiana e a matriz do solo (argilominerais, ácidos húmicos, complexos fenólicos), se tornado mais difícil a separação e extração do proteoma.

Segundo Nannipieri (2006) um dos maiores problemas metodológicos é extrair especificamente proteínas intracelulares na presença de um grande pano de fundo de proteínas extracelulares. Estas proteínas extracelulares estão estabilizadas, e conseqüentemente protegidas da ação de proteólises, através da sua associação com os colóides do solo. Ainda segundo este autor com base na distribuição das proteínas no solo o proteoma deste ambiente pode ser subdividido em duas categorias: proteoma funcional e proteoma estrutural. O proteoma funcional seria aquele extraído de dentro das células microbianas do solo, enquanto que no estrutural estariam incluídas aquelas proteínas extracelulares que já fazem parte da estrutura do solo adsorvidas em argilominerais e substâncias húmicas.

Muitos dos avanços no estudo do proteoma em amostras complexas se devem ao aperfeiçoamento de técnicas para separar e identificar as proteínas obtidas. Com relação à separação das proteínas obtidas existem várias técnicas, e uma tem se mostrado bastante útil é a eletroforese de gel bidimensional (2-DE). Nesse tipo de gel as proteínas são separadas na primeira dimensão em função da sua carga, e na segunda dimensão em relação ao seu peso molecular (Rocha et al., 2005). O resultado final consiste em um gel com diversos pontos (*spots*) dispersos, cada um correspondendo a uma proteína particular. O poder de separação é tão grande que duas proteínas que diferem em apenas um aminoácido podem ser prontamente distinguidas (Rocha et al., 2005).

Outra tecnologia que tem permitido uma melhor compreensão do proteoma é o uso de espectrômetro de massa, que permite a identificação de

proteínas mesmo em misturas complexas. Neste equipamento as proteínas são partidas em peptídeos de cadeia curta e as suas identidades são deduzidas a partir da comparação com banco de dados.

Apesar de existirem ainda alguns desafios a serem vencidos, principalmente no que se referem à extração das proteínas da matriz do solo, diferentes protocolos têm sido propostos para a extração do proteoma do solo.

Singleton et al. (2003) testaram diferentes protocolos de extração das proteínas de solos contaminados com Cd. Estes pesquisadores observaram uma redução de aproximadamente 35% na quantidade total de proteínas extraídas de solo contaminado com Cd em relação a um solo não contaminado. Eles ainda notaram um aumento na produção de proteínas de baixo peso molecular nas amostras contaminadas em relação às amostras controle e atribuíram a sua presença como sendo uma resposta dos microrganismos ao contaminante. Shulze et al. (2005) caracterizaram o proteoma de ambientes complexos como a água de um lago, soluções de solo e partículas de solo. Eles extraíram várias proteínas e identificaram as suas funções e sua origem filogenética. Entre as proteínas identificadas estavam enzimas relacionadas à degradação da matéria orgânica. Benndorf et al. (2007) desenvolveram um protocolo para a extração das proteínas do solo separando-as dos constituintes orgânicos e inorgânicos da matriz do solo. Quando estes autores adicionaram aos solos diclorofenoxiacético (2,4-D), foram extraídas, isoladas e identificadas enzimas relacionadas à degradação deste composto.

Os três autores citados anteriormente optaram por utilizar uma abordagem direta para extração do proteoma, ou seja, realizaram a extração diretamente das amostras de solo, e conseqüentemente um estudo do proteoma funcional e estrutural.

Maron et al. (2007a) desenvolveram uma estratégia indireta para avaliação do proteoma em amostras complexas. Eles optaram por primeiro extrair as células da comunidade bacteriana do solo, e só então extrair o proteoma destas células. Trabalhando com amostras de água com e sem

adição de mercúrio e cádmio observaram modificações no metaproteoma das amostras contaminadas em relação ao controle sem contaminante, indicando variações na estrutura funcional das comunidades. Estes mesmos autores testaram o protocolo desenvolvido em amostras de solo (Maron et al. 2008). Esse tipo de abordagem de extração indireta do proteoma pode aumentar a eficiência de extração das proteínas uma vez que não existe interferência da matriz do solo. Eles trabalharam com solos com e sem adição de resíduos orgânicos e não observaram diferenças na estrutura genética da comunidade bacteriana, mas observaram diferenças na estrutura funcional. Para a separação das proteínas obtidas foi utilizada a eletroforese de gel SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), entretanto estes pesquisadores não identificaram as moléculas resultantes da separação.

Devido à complexidade do solo e da dificuldade de extração e purificação do proteoma deste ambiente uma alternativa é trabalhar com um microrganismo indicador, com genoma e proteoma já conhecidos (Chourey et al., 2010; Taylor & Willians, 2010). A adição de um microrganismo no solo e a posterior extração do proteoma total (solo+microrganismo) pode dar um indicativo do poder de extração do método empregado. Para isso é necessário fazer uma comparação entre o proteoma da cultura pura com o proteoma de cultura+solo. Além disso, as alterações no proteoma do organismo indicador quando em contato com um ambiente impactado pode ser utilizado para definir e monitorar estratégias de recuperação.

Em uma revisão sobre metaproteoma de comunidades microbianas Maron et al. (2007b) propõe a utilização de proteínas com bioindicadores funcionais, pois mudanças no proteoma de um ambiente em resposta a um determinado stress poderiam estar relacionadas com mudanças na estrutura funcional da comunidade microbiana. Segundo estes autores proteínas identificadas como sendo induzidas ou reprimidas por um determinado distúrbio podem ser consideradas como indicadores funcionais.

Com base nos resultados obtidos pelos pesquisadores citados anteriormente observa-se que em todos os estudos envolvendo impactos no solo foi observada uma alteração no proteoma das comunidades microbianas



do solo quando comparados com uma amostra controle. Por isso o uso do proteoma como bioindicadores funcionais do solo em programas de monitoramento de ambientes impactados é promissor. Mas para que seu uso seja possível nesse tipo de avaliação é necessário aperfeiçoar e padronizar métodos de extração e identificação das proteínas do solo, e ainda relacionar a presença de proteínas com os impactos sofridos pelo solo.

## **2.5 Sistematização das informações e construção de índices de qualidade biológica do solo**

O último item a ser considerado no desenvolvimento e seleção de indicadores da qualidade do solo e do ambiente é a avaliação analítica dos resultados de forma interpretativa, informativa e preditiva das estratégias e decisões a serem tomadas. Nesse sentido, algumas tentativas têm sido feitas no sentido da avaliação integrada dos resultados, utilizando-se para isso índices e diagramas que integram os resultados quantitativamente e graficamente.

Em 1994, Lal propôs um índice cumulativo compreendido entre 10 e 50 pontos para expressar o grau de sustentabilidade do solo ou uso da terra, utilizando-se para o cálculo, os dez indicadores mais relevantes para o solo em estudo ou determinado tipo de uso da terra. Cada indicador seria avaliado ponderando-se valores de 1 a 5, conforme apresentassem, respectivamente: nenhuma, leve, moderada, severa e extrema limitação. Os pesos atribuídos a cada indicador então eram somados e obtido um índice compreendido entre 10 e 50 pontos, sendo que o ambiente é considerado altamente sustentável quando o índice for menor do que 20; sustentável quando compreendido entre 20 e 25; sustentável com alta taxa de insumos, entre 25 e 30; sustentável com outro uso da terra, entre 30 e 40; e não sustentável quando o índice atingir mais de 40 pontos.

Outra opção seria a utilização de técnicas que misturam procedimentos quantitativos e qualitativos para apresentar e avaliar integradamente os indicadores de Qualidade do Solo. O *Amoeba approach*, diagramas e índices de qualidade do solo (SQI) objetivam sistematizar e

organizar um grande volume de dados (Schloter et al., 2006). A proposta da *Amoeba* (acróstico para Método Geral para Descrição e Avaliação do Ecossistema) resulta em um gráfico radial contendo todos os valores dos indicadores, organizados em relação a uma situação desejável ou ambiente não alterado. O diagrama e os resultados podem ser organizados em porcentagem, tendo os valores de referência o valor de 100%. Os valores indexados utilizados para construir o *Amoeba* podem ser posteriormente condensados no índice de Qualidade de Solo (SQI), por meio de uma análise fatorial dos desvios em relação ao valor de referência.

Ainda nesse mesmo sentido, Casalinho (2003) propôs a utilização do Método Integrativo de Avaliação da Qualidade do Solo (MIAQS), desenvolvido a partir dos trabalhos de Doran & Parkin (1994), Maser et al. (1999), Ensslin et al. (2001) e Andrews et al. (2002), a fim de se verificar o comportamento de um conjunto de indicadores frente a um determinado sistema de manejo, ao longo do tempo. O método proposto é constituído pelos seguintes procedimentos ou etapas: a) seleção de um conjunto mínimo de indicadores, considerando tanto o saber científico quanto o saber popular; b) avaliação dos indicadores; c) identificação do desempenho (valores quantitativos) de cada indicador que represente seu nível de limitação à produção agrícola, fundamentado em resultados de pesquisa, em revisão bibliográfica e na experiência do pesquisador; d) identificação, entre os resultados obtidos para cada propriedade, dos valores que expressam os melhores e os piores desempenhos dos indicadores; e) construção de descritores quantitativos contínuos para cada indicador, definidos como o conjunto de cinco níveis de impacto que descreve seus desempenhos e cujos valores extremos correspondem, respectivamente, ao de menor atratividade identificado pela literatura e o de maior atratividade, correspondendo aos melhores valores encontrados nas propriedades, atribuindo-lhes pesos zero e dez, respectivamente; f) definição dos três níveis de impacto intermediários dos descritores, dividindo-se a diferença entre os valores de melhor e pior atratividade por quatro; g) atribuição, por juízo de valor, de índices ponderados a cada um dos três níveis de impactos intermediários dos descritores, considerando o grau de importância de cada indicador frente às funções que

foram estabelecidas para o solo no agroecossistema e o quanto poderia melhorar seu desempenho, ao passar de um nível de impacto para outro, levando-se em conta a experiência do pesquisador e dados referenciais existentes sobre seu desempenho; h) determinação, por interpolação matemática, dos índices ponderados correspondentes ao desempenho de cada indicador, a partir dos valores obtidos em suas análises; i) integração quantitativa dos valores ponderados por meio de índices biológicos de qualidade do solo e de testes estatísticos multivariados; j) análise e interpretação dos resultados.

Em todas as situações apresentadas são apenas tentativas de mostrar visualmente a resposta do ambiente amostrado em relação aos indicadores estabelecidos. Trata-se unicamente de estabelecer um arranjo de forma a favorecer a visualização de um conjunto de resultados. Não se trata e nem apresenta indícios de uma análise sistêmica do ecossistema de forma a subsidiar simulações, decisões, estratégias e uma avaliação integrada do ambiente.

Conforme definido anteriormente, avaliação ambiental sistêmica demanda indicadores de primeira ordem, de segunda ordem e de terceira ordem. Como desafio à pesquisa, será tentativamente desenvolvido indicadores de terceira geração. Esta é a denominação genérica dada por pesquisadores da Comunidade Européia, para indicadores que possam apontar o melhor uso do meio por parte do ser humano. A maior dificuldade, de todos os interessados nesta construção, é ter visão de mundo que deixe de ver o problema no meio, e leve o ser humano a perceber-se no centro dos problemas. Em outras palavras, o desafio está em avaliar a QUALIDADE DO USO que fazemos do meio, e não SOMENTE o estado do meio. Uma questão ambiental pode ser função de estado do meio, mas quase sempre tem origem e natureza comportamental humana. Por isso a avaliação ambiental precisa ser feita medindo comportamentos de partes do meio, mas para avaliar o desempenho ambiental humano, não do meio. Petróleo derramado no solo não é perigoso, mas indesejável naquele meio. Perigoso foi o procedimento que o levou a derramar. O quanto perigoso é esse procedimento pode ser avaliado

medindo conseqüências sobre a biologia do solo, por exemplo. Um exemplo de indicador de terceira geração que será testado e adaptado para as condições do projeto é o Situa-te. Este é instrumento que permite avaliar o estado geral do objeto de gestão, bem como identificar quais as melhores ações a serem efetuadas no sistema. Possibilita também a cada participante do grupo avaliar-se - perceber se o seu entendimento facilita, enriquece, complica ou empobrece o entendimento coletivo que está sendo construído.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Seleção de Métodos para Avaliação da Qualidade Biológica do Solo

Para testar e selecionar metodologias para avaliação da biomassa, atividade e diversidade microbiana no solo, foram realizadas amostragens de solo em áreas sob diferentes usos.

##### 3.1.1 Áreas avaliadas

Os locais de amostragem foram:

- Município de Eldorado do Sul (RS), Estação Experimental da Faculdade de Agronomia . Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Argissolo Vermelho distrófico típico
  - Área sob cultivo de eucalipto (*Eucalyptus sp.*) há 20 anos;
  - Área sob campo nativo;
  
- Município de Tio Hugo (RS), Latossolo vermelho distrófico.
  - Área sob plantio direto há 20 anos, sempre utilizando a sucessão soja (*Glycine max L.*) / trigo (*Triticum aestivum*). Recebeu aplicação de corretivos e fertilizantes conforme recomendação de análise de solo;
  - Área sob mata nativa;
  
- Município de Londrina (PR), Latossolo Vermelho distroférico.
  - Área sob cultivo de cana de açúcar sob sistema tradicional de cultivo há 15 anos. O canavial é renovado a cada 4 anos, sendo que a última

renovação foi em 2008. A colheita é realizada com queima seguida do corte. Recebe aplicação de corretivos de acidez.

- Área sob plantio convencional por 31 anos sempre utilizando a sucessão soja (*Glycine max L.*) / trigo (*Triticum aestivum*). Recebeu aplicação de corretivos e fertilizantes conforme recomendação de análise de solo;

- Área sob plantio direto por 31 anos sem revolvimento, sempre utilizando a sucessão soja (*Glycine max L.*) / trigo (*Triticum aestivum*). Recebeu aplicação de corretivos e fertilizantes conforme recomendação de análise de solo;

- Área sob mata nativa.

As amostragens nestas áreas foram realizadas no verão (janeiro/2009) e no inverno (julho/2009). Em cada área foram marcados quatro pontos fixos, de onde foram retiradas as amostras compostas de solo, na profundidade de 0-10cm, utilizado-se um trado calador. Em todas as áreas avaliadas foram amostrados solos sob vegetação nativa para serem utilizados como referência. As amostras foram armazenadas em sacos plásticos e transportadas até o laboratório, onde foram homogeneizadas, peneiradas (2 mm) e refrigeradas a 4° C, com umidade de campo, até o momento da realização das análises microbiológicas. Foi retirada uma porção de 50 g de solo de cada amostra para a determinação do teor de umidade, por secagem em estufa a 105°C até peso constante. Os valores de umidade gravimétrica dos solos na ocasião das amostragens estão apresentados no Apêndice 01.

As análises realizadas nestas amostras foram: biomassa microbiana por três diferentes metodologias; atividade microbiana por quatro diferentes metodologias; e uma metodologia para avaliar a diversidade microbiana. As repetições de campo foram manipuladas como amostras independentes para a realização destas análises.

### 3.1.2 Avaliações da Biomassa Microbiana

Como um dos objetivos deste trabalho é a seleção de métodos para avaliação da biomassa microbiana no solo foram testadas três metodologias comumente utilizadas para a quantificação deste atributo: Fumigação-

Incubação (Jenkinson & Powlson, 1976), Fumigação-Extração (Vance et al., 1987) e Respiração Induzida por Substrato (Anderson & Domsch, 1978).

### 3.1.2.1 Fumigação-Incubação

Para esta análise foi utilizado o método proposto por Jenkinson & Powlson (1976) com algumas modificações descritas a seguir.

Foram utilizadas, de cada amostra de solo, duas alíquotas cujo teor de umidade era equivalente a 50% da capacidade de retenção de água. Uma delas, pesando 50 g, foi colocada em recipientes de vidro com tampas de fechamento hermético e capacidade de 800 ml. A segunda amostra, pesando 45 g, foi colocada em copo de vidro de 200 ml e fumigada em dessecador acoplado a uma bomba de vácuo, contendo um becker de 50 ml com 20 ml de clorofórmio livre de álcool e com as paredes do dessecador forradas com papel úmido. As amostras de solo foram mantidas em dessecador por 24 horas. Após o período de fumigação, o vapor de clorofórmio foi retirado, as amostras então retiradas do dessecador e colocadas também em recipientes de vidro com tampas de fechamento hermético e capacidade de 800 ml. Os solos fumigados foram inoculados com 5,0 g de solo, da mesma amostra original. Com uma espátula, foi feita a homogeneização de todas as amostras de solo e, em cada vidro, foi colocado um copo plástico de 80 ml, contendo 20 ml de NaOH 0,5 M. As amostras foram mantidas no escuro por dez dias à 28°C. A quantidade de CO<sub>2</sub> liberada do solo foi determinada após adição de 3,0 ml de BaCl<sub>2</sub> 30% e posterior titulação com HCl 0,3 M, usando fenolftaleína 1% como indicador. Foram utilizados como controle, três recipientes de vidro sem solo contendo a mesma solução de NaOH. Para o cálculo da quantidade de CO<sub>2</sub> liberada, tanto das amostras fumigadas, quanto das amostras não fumigadas foi utilizada a seguinte fórmula proposta por Jenkinson et al. (1976):

$$\text{mg C-CO}_2 = (C-A) \cdot M \cdot E$$

onde:

C= volume (ml) do ácido usado para titular a base referente ao controle;

A= volume (ml) do ácido usado para titular a base referente a amostra fumigada ou não fumigada;

M= molaridade do ácido;

E= equivalente grama do carbono (6).

O cálculo da biomassa foi feito utilizando-se a seguinte fórmula:

$$BM = (C_F) - (C_{NF}) / K_{EC}$$

Onde  $C_F$  e  $C_{NF}$  representam o carbono extraído dos solos fumigado e não fumigado e  $K_{EC}$  é a proporção total de carbono microbiano extraído após fumigação.

Além das repetições de campo nesta análise foram ainda realizadas duas repetições de laboratório.

### 3.1.2.2 Fumigação-Extração

Para esta análise foi utilizado o método descrito por Vance et al., (1987).

Foram pesados, em duplicata, 20g de solo. Uma amostra foi fumigada com o mesmo processo descrito no item 5.2.1.1, e a outra mantida em frascos de vidro de 200ml, no escuro, pelo mesmo período. Após a fumigação as amostras foram retiradas do dessecador e também acondicionadas em frascos de vidro de 200ml. Para o processo de extração do carbono foi adicionado em cada frasco 50ml de  $K_2SO_4$  0,5M e o conjunto foi mantido sob agitação (170rpm) por 1h. Após este período as amostras foram filtradas em papel filtro nº42 e desse extrato foi retirada uma alíquota de 0,5ml para um tudo de ensaio de 10ml. Nesse tudo foram ainda adicionados 0,5ml de solução extratora ( $K_2SO_4$  0,5M), 1,0ml de solução de Mn(III) . pirofosfato ( $Na_2P_2O_7$ ) e 1,0ml de  $H_2SO_4$  concentrado. O conjunto foi então homogeneizado por agitação, deixado em repouso por 16h e, depois, foi realizada a leitura na absorbância em espectrômetro digital (SpectrumLab 22PC) a 495nm. Paralelamente as amostras foi montada uma curva padrão de 0 (somente  $K_2SO_4$  0,5M) a  $120mg\ l^{-1}$  de C utilizando ácido oxálico. Foram utilizados 1ml



dos padrões, 1,0ml de solução de Mn(III) . pirofosfato e 1,0ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado.

O cálculo da biomassa foi feito utilizando-se a seguinte fórmula:

$$BM = (C_F) - (C_{NF}) / K_{EC}$$

Onde C<sub>F</sub> e C<sub>NF</sub> representam o carbono extraído dos solos fumigado e não fumigado e K<sub>EC</sub> é a proporção total de carbono microbiano extraído após fumigação.

Além das repetições de campo nesta análise foram ainda realizadas três repetições de laboratório.

### 3.1.2.3 Respiração Induzida por Substrato

Para esta análise foi utilizada a metodologia de Anderson & Domsch (1978) descrita por Höper (2006).

Em um frasco de fechamento hermético foi adicionado o equivalente a 20g de solo seco e 60mg de sacarose. A amostra foi pré-incubada por 2h a 25°C. Após este período foram colocados dentro dos frascos copinhos plásticos contendo 20ml de de NaOH 0,025M e as amostras foram novamente incubadas por 4h a 25°C. A quantidade de CO<sub>2</sub> liberada do solo foi determinada com adição de 1,0 ml de BaCl<sub>2</sub> 0,5M e posterior titulação com HCl 0,025M, usando fenolftaleína 1% como indicador. Foram utilizados como controle, três recipientes de vidro sem solo contendo a mesma solução de NaOH. O carbono da biomassa microbiana foi determinado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$C_{mic} = 30(V_b . V_a) \frac{K \times 22 \times 1000}{1,8295 \times PA \times 4}$$

Onde:

C<sub>mic</sub> = carbono da biomassa microbiana (mg C<sub>mic</sub>/Kg de solo seco);

V<sub>b</sub> = média do volume (ml) de HCl gasto para titular os cinco brancos;

Va = ml HCl gastos para titular as amostras;  
K = concentração da solução de HCl;  
22 = fator de conversão (1ml HCl 1M corresponde a 22mg de CO<sub>2</sub>);  
1000 = fator de conversão de g de solo pra Kg de solo;  
1,8295 = densidade do CO<sub>2</sub> a 22°C;  
PA = peso da amostra (g de solo seco);  
4 = fator de conversão de 4h para 1h.

Além das repetições de campo nesta análise foram ainda realizadas duas repetições de laboratório para cada amostra.

### 3.1.3 Avaliações da Atividade Microbiana

#### 3.1.3.1 Respiração Basal

A avaliação da respiração microbiana (RM) foi realizada juntamente com a avaliação do CBM, sendo estimada pela quantidade de CO<sub>2</sub> liberado do solo não fumigado durante 20 dias de incubação (Stotzky, 1972).

As unidades experimentais foram constituídas por recipientes de vidro de 800 ml com tampas herméticas. Foi utilizada uma amostra de 50 g de solo, incubada a temperatura ambiente, com a umidade ajustada para 50% de sua capacidade de campo. Também foram utilizados três recipientes sem solo como controle. O CO<sub>2</sub> produzido foi capturado por 20ml de uma solução de NaOH 0,5 M e quantificado por titulação com HCl 0,3 M, sendo adicionado anteriormente 3 ml de BaCl<sub>2</sub> 30% e utilizado fenolftaleína a 1% como indicador. Durante esse período, foram realizadas duas titulações, a primeira aos dez dias e a segunda aos vinte dias após o início da incubação das amostras, sendo os valores somados para obter-se o valor referente ao período de 0 a 20 dias de incubação. Os dados de respiração microbiana foram expressos em mg C-CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> solo seco.

Além das repetições de campo nesta análise foram ainda realizadas duas repetições de laboratório.

### 3.1.3.2 Hidrólise do Diacetato de Fluoresceína

A hidrólise do diacetato de fluoresceína (DAF) foi determinada utilizando-se a metodologia de Green et al. (2006) com algumas alterações descritas a seguir. Foi incubada, em duplicata, 1g solo com 20 ml de tampão fosfato de sódio 60mM a 25°C durante 15 minutos sob agitação a 100rpm. Após este período foi adicionado 100µl da solução de DAF 4,8 mM somente em uma das duplicatas. As amostras foram então agitadas por mais 1h e 45 minutos (100rpm, 25°C), e após foi adicionado 20ml de acetona em cada frasco, e solução de DAF 4,8mM nas amostras controle (que não receberam esta solução antes da incubação). Foram então centrifugadas a 6000rpm por 5 minutos, e filtradas em papel filtro Whatman nº4. Foi medida a intensidade da cor amarela, em espectrofotômetro (SpectrumLab 22PC) a 490nm, e a concentração de fluoresceína calculada com o auxílio de uma curva padrão contendo 0,25, 0,75, 2,0, 3,74 e 7,48 µg de fluoresceína (F) por ml. Os resultados foram expressos em µg F g<sup>-1</sup> de solo seco.

Além das repetições de campo nesta análise foram ainda realizadas duas repetições de laboratório.

### 3.1.3.3 Atividade da Desidrogenase

Para medir a atividade da desidrogenase utilizou-se a metodologia descrita por Alef (1998) que utiliza TTC (cloreto de 2,3,5 . trifeniltetrazolio) como substrato para a ação desta enzima. Foram pesados 5 g de solo úmido, em duplicata, em tubos de vidro. Em uma das duplicatas foi adicionado 5 ml de tampão tris-HCl com TTC 0,5g l<sup>-1</sup> enquanto que na outra (controle) foi adicionado apenas tris-HCl. Os tubos foram incubados a 30°C por 24h e após a este período foi adicionado 40 ml de acetona e incubado no escuro a temperatura ambiente por mais 2h. A suspensão foi então filtrada em papel filtro Whatman nº4 e a intensidade da cor vermelha foi medida em espectrofotômetro (SpectrumLab 22PC) a 546 nm (absorbância). As

concentrações de TPF (trifenilformazan) foram calculadas com auxílio de uma curva padrão com 0, 5, 10, 20, 30 e 40  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de TPF. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g TPF g}^{-1}$  de solo seco.

Além das repetições de campo nesta análise foram ainda realizadas três repetições de laboratório.

#### 3.1.3.4 Mineralização do Nitrogênio

Foi utilizado o método anaeróbio descrito por Canali & Benedetti (2006) que é baseado na incubação de solo saturado por sete dias a 40°C, e o amônio é mensurado no solo antes e depois da incubação. A taxa de mineralização é determinada por meio da subtração da concentração inicial de N-NH<sub>4</sub> do solo da concentração final.

Foram pesadas 16 g de solo em frascos de vidro onde foram adicionados 40 ml de água destilada, e o conjunto foi incubado durante 7 dias a 40°C. Após este período a suspensão solo-água foi transferida para frascos de 250 ml onde também foi adicionado 40ml de KCl 4M para extrair o N-NH<sub>4</sub> do solo. A suspensão solo-água-KCl foi agitada durante 1h em agitador horizontal a 170rpm e após o sobrenadante foi filtrado em papel filtro nº4. No extrato obtido foi determinada a concentração N-NH<sub>4</sub> através de destilação a vapor (Tedesco et al., 1995). Para a determinação da concentração inicial de amônio nas amostras também foram utilizadas 16g de solo, 40ml de água destilada e 40ml de KCl 4M e o procedimento foi o mesmo já descrito anteriormente para as amostras incubadas.

Além das repetições de campo nesta análise foram ainda realizadas três repetições de laboratório.

#### 3.1.4 Avaliações da Diversidade Microbiana

##### 3.1.4.1 BIOLOG

Para a avaliação da diversidade metabólica foram utilizadas microplacas ECOplate (Biolog inc.). Cada placa possui 31 fontes de carbono além do branco (água), em triplicata, totalizando 96 poços. A relação dos substratos presentes está apresentada na Tabela 01.

**Tabela 01-** Fontes de carbono contidas nas microplacas Biolog. Categorização dos substratos de carbono de acordo com Insan (1997).

Categoria	Nome da fonte de Carbono
Polímero	Glicogênio Tween 40 Tween 80 -Ciclodextrina
Carboidrato	D-Celobiose i-Eritritol -D-Lactose -Metil-D-Glicosídeo D-Xilose D-Manitol N-Acetil-D-Glicosamina Ácido D-Galacturônico -
Ácido Carboxílico	Lactona Ácido -Hidroxibutírico Ácido Itacônico Ácido -Cetobutírico Ácido-D-glicosamínico Ácido D-Galacturônico Ácido D-Málico Éster Metílico do Ácido
Aminoácido	Pirúvico L-Serina L-Arginina L-Asparagina L-Fenilalanina L-Treonina Ácido Glicil-L-Glutâmico
Fenólico	Ácido 2-Hidroxibenzóico Ácido 4-Hidroxibenzóico
Amina/Amida	Feniletlanina Putrescina
Miscelânea	D, L- -Glicerol fosfato Glicose-1-fosfato

Foi feita uma suspensão com 5g de solo e 95 ml de solução salina 0,85%, que foi agitada por 20 minutos a 200rpm. Após este período as amostras foram deixadas em repouso por 5 minutos, à temperatura ambiente, para decantação das partículas mais grosseiras. O sobrenadante foi transferido para tubos estéreis e centrifugado a 6000rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em 10 ml de solução salina 0,85%. As amostras foram deixadas em repouso por 2 horas, à temperatura ambiente, e após foram inoculadas alíquotas de 120µl de amostra em cada poço da placa BIOLOG-Eco. As microplacas foram então incubadas no escuro a 28°C por 72h. O crescimento microbiano, e conseqüentemente a utilização da fonte de carbono, foi avaliado por espectrofotometria a 590nm, utilizando-se um leitor de microplacas. Para avaliação da diversidade foi utilizado o índice de Shannon-Weaver, com a aplicação da fórmula proposta por Derry et al. (1998).

### 3.1.5 Análise Estatística

Os resultados de biomassa obtidos pelos três métodos foram comparados através de uma análise de correlação. As médias de cada atributo microbiológico avaliado foram comparadas entre si através do teste de Tukey, ao nível de significância de 10%, utilizado o programa STATISTIC 7.0.

Nos resultados obtidos em Londrina foi ainda realizada a Análise de Componentes Principais de maneira a considerar todos os atributos biológicos em conjunto e diferenciar os tratamentos, também utilizado o programa STATISTIC 7.0.

## **3.2 Proteoma do solo e da solução de solo contaminado com cobre**

Este estudo foi realizado na Universidade de Firenze (Itália). Nesta etapa do trabalho foi desenvolvido um novo protocolo para extração e purificação do proteoma do solo e da solução de solos contaminados com Cobre.

### 3.2.1 Proteoma do Solo

### 3.2.1.1 Seleção e descrição da área de estudo

O solo escolhido para a realização do estudo possui altos níveis de Cobre e é oriundo de um experimento localizado em Geronde, França. Optou-se por utilizar o solo deste local por se tratar de uma área já amplamente estudada e caracterizada quimicamente e fisicamente, portanto com uma grande quantidade de dados para auxiliar na interpretação dos resultados de proteômica obtidos.

A área experimental foi estabelecida em 2006 e é constituída de 16 parcelas (1m x 3m) divididas entre quatro tratamentos:

- 1) **CD**: 0,2% calcário dolomítico contendo 30% CaO e 20% MgO combinado com carbonatos;
- 2) **CO**: 5% composto derivado da compostagem (9-12 meses) de madeira com esterco de galinha;
- 3) **CDCO**: CD combinado com CO;
- 4) **ST**: solo sem tratamento.

Todos os tratamentos apresentam quatro repetições distribuídas ao acaso na área e as amostras de solo foram coletadas na profundidade de 0-25 cm. Para este estudo de proteômica foram utilizados somente os tratamentos CDCO e ST, pois são os dois tratamentos mais contrastantes em relação aos níveis de Cobre disponível. O solo sem tratamento (ST) apresenta altos teores de Cobre (1100mg Cu Kg<sup>-1</sup> de solo), enquanto que o solo tratado (CDCO) tem níveis de Cobre quatro vezes menor em relação ao não tratado (260mg Cu Kg<sup>-1</sup> de solo).

### 3.2.1.2 Curvas de crescimento do microrganismo indicador

Optou-se por adicionar ao solo um microrganismo indicador antes da extração do proteoma. Como já foi apresentado anteriormente na Revisão Bibliográfica a adição deste microrganismo no solo e a posterior extração do proteoma total (solo+microrganismo) podem dar um indicativo do poder de extração do método empregado. Além disso, as alterações no proteoma desse organismo quando em contato com o solo contaminado podem auxiliar a definir e monitorar estratégias de recuperação deste ambiente. Antes da utilização do

microrganismo indicador foram realizados alguns testes para entender a dinâmica deste organismo em contato com o solo e também com o Cobre.

Para a realização deste estudo foi selecionado como microrganismo indicador a bactéria *Cupriavidus metallidurans* CH34. Este organismo foi escolhido porque já teve seu proteoma estudado (Noël-Georis et al., 2004) e é altamente resistente a diferentes metais pesados. Além disso, em presença de Cobre expressa proteínas relativas a mecanismos de resistência a este metal (Noël-Georis et al., 2004), apresentando assim potencial para ser utilizado no monitoramento de áreas contaminadas com este elemento.

Para entender a dinâmica do microrganismo indicador (*C. metallidurans* CH34) em contato com Cobre foi realizado um estudo para avaliar o seu desenvolvimento na presença deste elemento. Para isso foram realizadas curvas de crescimento utilizando o meio líquido mineral 284 contendo gluconato de sódio 0,2%. As concentrações de Cobre escolhidas foram baseadas na concentração deste metal no solo a ser estudado.

Para a preparação do meio foram utilizados os seguintes reagentes em g l<sup>-1</sup>: 4,18 C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>4</sub>S; 4,68 NaCl; 1,49 KCl; 1,07 NH<sub>4</sub>Cl; 0,43 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,20 MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O; 0,30 CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O. Todos os reagentes foram dissolvidos em água destilada estéril e foram ainda adicionados: 294 mg C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>6</sub>P, 10ml C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>.Fe.NH<sub>3</sub> (estéril), 1 ml de SI7 Spoorelementen (HCl 10 mM, ZnSO<sub>4</sub> 0,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 1mM, CoCl<sub>2</sub> 0,8mM, CuCl<sub>2</sub> 0,1 mM, NiCl<sub>2</sub> 0,1mM, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 0,15mM) e 2g NaC<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>7</sub> (0.2%) como fonte de carbono. O pH foi ajustado em 7,0 com adição de NaOH, o volume ajustado até 1l (Mergeay, 1985) e foi esterilizado em autoclave a 1atm por 20 minutos.

Foram testadas três concentrações de Cu: 1,0; 2,0 e 5,0 mM. A cultura foi mantida no meio mineral 284 sem adição de Cobre sob agitação a 30°C até OD<sub>660</sub>=0,600, indicando que a fase exponencial tinha sido alcançada. A densidade ótica de 0,6 corresponde a 10<sup>9</sup> células bacterianas por ml. Foi então retirada uma alíquota desta suspensão que foi adicionada em meio mineral 284 contendo Cobre (1,0; 2,0 e 5,0 mM) até OD<sub>660</sub>=0,100. Esta suspensão foi mantida sob agitação a 30°C e nas primeiras 7h foi retirada uma alíquota a cada uma hora para leitura na absorbância em espectrofotômetro



(Lambda 4, Perkin Elmer). Após este período as leituras foram realizadas a cada 30min. Esta operação foi realizada até a cultura atingir  $OD_{660} = 1,0$ .

#### 3.2.1.3 Viabilidade do microrganismo indicador em contato com o solo

A viabilidade do microrganismo indicador em contato com o solo foi mensurada através da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) após diferentes tempos de incubação.

Inicialmente uma colônia da cultura foi retirada de uma placa contendo meio LB e inoculada em meio mineral líquido suplementado com 0,2% de gluconato e mantida sob agitação a 30°C até  $OD_{660} = 0,600$ . O meio contendo a bactéria foi então centrifugado a 5000rpm (15min, 4°C), o sobrenadante descartado e o pellet obtido foi ressuscitado em 1ml de meio líquido mineral 284. Microcosmos foram preparados adicionando-se em uma placa estéril 4g de solo seco e 1ml da suspensão de células bacterianas. Foram retiradas amostras logo após a preparação dos microcosmos, e após 2, 4 e 10 dias de incubação a 28°C. Para a contagem das unidades formadoras de colônia foi utilizada a metodologia descrita por Lorch et al. (1995). As suspensões de células obtidas após as diluições seriadas ( $10^{-1}$  até  $10^{-6}$ ) foram inoculadas em placas contendo meio sólido LB (Luria-Bertani) e estas foram incubadas a 28°C por 72 horas. Paralelamente, para cada tempo avaliado, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônia nas amostras de solo sem a adição do microrganismo indicador. Estes solos também foram mantidos incubados em placas estéreis a 28°C.

#### 3.2.1.4 Preparação das amostras para extração do proteoma

A bactéria *C. metalludurans* CH34 foi inoculada em meio líquido 284 contendo 0,2% de gluconato como fonte de carbono e mantida a 30°C sob agitação até  $OD_{0,660} = 0,600$ . O meio contendo a bactéria foi então centrifugado a 5000rpm (15min, 4°C), o sobrenadante descartado e o pellet obtido foi ressuscitado em 1ml de meio líquido 284 e imediatamente adicionado em 4g de solo e incubado a 28°C por 48h. A bactéria foi também inoculada em meio líquido mineral 284 com e sem adição de Cobre e mantida sob agitação a 30°C

até  $OD_{0,660}=0,600$ . A concentração de Cobre utilizada foi de 0,8mM, que é equivalente ao teor desse elemento no solo sem tratamento.

A análise de proteômica foi realizada na bactéria *C.metalludurans* CH34 exposta e não exposta ao Cobre e nos solos (com e sem tratamento) inoculados e não inoculados com este microrganismo.

### 3.2.1.5 Extração, purificação e quantificação das proteínas do solo

As proteínas foram extraídas utilizando 4ml de tampão de lise contendo tampão fosfato salino (PBS) 20mM, dodecil sulfato de sódio (SDS) 1%, DNase ( $1\text{mg ml}^{-1}$ ) e RNase ( $1\text{mg ml}^{-1}$ ) e 100 $\mu\text{l}$  de coquetel inibidor de protease. As amostras foram então sonicadas a 400W (UP 400s, BioClass) por 2 minutos a 4°C e então centrifugadas a 14000 rpm por 10 minutos. Para a purificação o sobrenadante obtido após a centrifugação foi filtrado em uma coluna com polivinilpirrolidona (PVP) acidificada com  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,005\text{mol l}^{-1}$  (Figura 1) e em filtro estéril 0,45 $\mu\text{m}$ . Após a filtração foi obtido aproximadamente 4ml de amostra e uma nova etapa de purificação foi realizada com a adição de 0,4ml desoxicolato 10% e 0,4ml de ácido tricloroacético 10%. A solução resultante foi então centrifugada por 10 minutos a 14000rpm e o pellet obtido foi ressuspendido em PBS1x e SDS 1%. O pH foi então neutralizado e foi realizada a precipitação das proteínas com a adição de 16ml de acetona e incubação a -20°C (overnight). Após este período as amostras foram centrifugadas a 5000rpm por 20 minutos a 4°C e o pellet obtido foi ressuspendido em 150 $\mu\text{l}$  de PBS/SDS 1%. Para a última etapa da purificação foram adicionados 150 $\mu\text{l}$  de clorofórmio, 600 $\mu\text{l}$  de metanol e 450  $\mu\text{l}$  de água ultrapura estéril e as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante que estava acima de um disco branco (proteínas) foi descartado e foi adicionado 450 $\mu\text{l}$  de metanol. Foi realizada uma nova centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado. As proteínas obtidas (pellet) foram então ressuspendidas em tampão uréia CHAPS (uréia 8M, CHAPS 4% e DDT 20mM) e mantidas a -4°C até a realização da eletroforese de gel bidimensional (2-DE).



**Figura 01-** Coluna de polivinilpirrolidona (PVP).

Antes da 2-DE as proteínas obtidas foram quantificadas pelo método de Bradford (1976) utilizando como referência albumina bovina.

#### 3.2.1.6 Análise das proteínas

Para separação das proteínas foi utilizada a eletroforese de gel bidimensional (2-DE). Nesta técnica as proteínas são separadas em função da sua carga e massa molecular. A separação em função da carga é feita através da isoeletrofocalização (IEF), geralmente chamada de 1° dimensão, enquanto que a separação em função da massa molecular é realizada através de eletroforese com géis de poliacrilamida, e é chamada de 2° dimensão.

A primeira dimensão (IEF) foi realizada em tiras com gradiente imobilizado de pH (IPG) (tiras com pH 4,0-7,0 e 18cm comprimento) e foi utilizado o sistema Ettan™ IPGphor™ (GE Healthcare) (Figura 02). Para esta etapa foram adicionadas 350µg de proteínas diluídas em 350µl de solução em cada tira. Os géis foram reidratados em uma solução de CHAPS 4%, uréia 8M, anfólitos 0,2% (*IPG buffer pH4-7*), ditioneitol 20mM e azul de bromofenol. As tiras foram então focalizadas a 20°C de acordo com as seguintes condições elétricas:

- 1) etapa 1: 200V por 1 hora, esta baixa voltagem é aplicada para remover íons salinos e cargas contaminantes;
- 2) etapa 2: de 300V a 3500V em 30 minutos;
- 3) etapa 3: 3500V por 3 horas, de 3500V a 8000V em 30 minutos;
- 4) etapa 4: a voltagem foi de 8000V até 80000V para permitir a completa focalização das tiras.



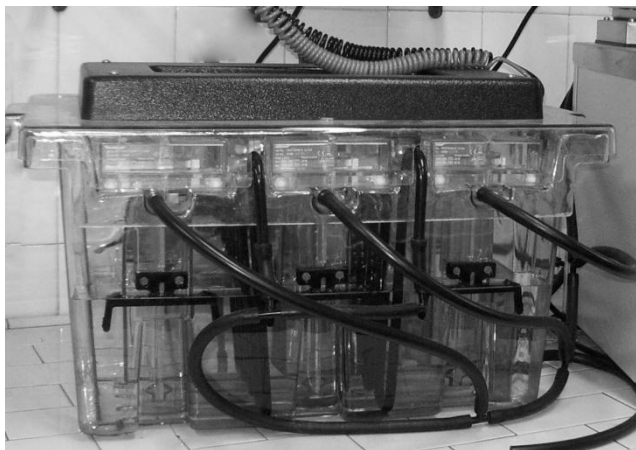
**Figura 02-** Sistema Ettan™ IPGphor™ (GE Healthcare) para separação de proteínas em função do seu ponto isoelétrico

Após a IEF as tiras IPG foram equilibradas por 10 minutos, sob agitação, em 5ml de tampão de equilíbrio (uréia 6M, glicerol 30%, SDS 2%, Tris-HCl 0,05M pH 6,8) com 2% de DTT. Após este período foi removida a primeira solução e adicionada uma segunda contendo 5ml de tampão de equilíbrio com 2,5% de iodoacetamida, e as tiras foram mantidas sob agitação por mais 5 minutos.

Para a realização da segunda etapa (2ª dimensão) foi utilizado o sistema Protean Multi Cell XL (Bio-Rad) (Figura 03) e géis de gradiente linear de poli(acrilamida) 9-16% (18 x 20cm x 1,5mm de espessura). As tiras obtidas após a isoeletrofocalização foram posicionadas sobre géis de acrilamida e sobre a tira foi adicionada uma camada de 5mm de gel de agarose 0,5% em tampão Tris-HCl contendo 0,002% de bromofenol. Durante a eletroforese foi mantida a temperatura de 10°C e uma corrente de 40µA/gel. A corrida foi realizada até o azul de bromofenol atingir a borda inferior do gel.

Após a eletroforese as proteínas foram fixadas utilizando uma solução de metanol 40% e ácido acético 10%, com uma incubação de 1h sob agitação. Os géis foram então lavados com água destilada por 10 minutos. O tratamento de fixação foi repetido duas vezes. Para a visualização dos pontos protéicos (*%spots*) os géis foram colorados com Comassie Brilliant Blue, e mantidos *%overnight* nessa solução sob agitação. Após este período foram feitas várias lavagens com uma solução de ácido acético 1%, sempre sob

agitação, até o fundo se tornar transparente. A faixa de detecção do comassie coloidal é de 50-500ng de proteínas. Para cada amostra foram feitos três géis.



**Figura 03-** Sistema Protean Multi Cell XL (Bio-Rad) para separação de proteínas em função da sua dimensão.

As imagens dos géis bidimensionais foram obtidas utilizando um scanner (Epson expression 1680 PRO) e após foram analisadas no software Image Master 2D Platinum (GE Healthcare). Este programa detecta os pontos protéicos em cada gel e depois faz a combinação entre os pontos presentes nas 3 replicas. Desta maneira é possível observar diferenças qualitativas e quantitativas entre os tratamentos. Os pontos protéicos foram detectados automaticamente pelo programa, mas em seguida algumas correções foram feitas manualmente. Os  $\%spots$  foram quantificados em unidades de volume (área X intensidade) e a normalização foi efetuada dividindo-se o volume de cada  $\%spot$  pela soma total dos volumes de todos os  $\%spots$ , sendo os resultados apresentados em porcentagem de volume.

Após foram comparados os géis da cultura pura com os géis do solo tratado e não tratado inoculados com a cultura. Os pontos protéicos que apresentaram diferenças entre os tratamentos foram então selecionados e as porcentagens de volume foram comparadas estatisticamente. Para isso foi utilizado o programa Statistica 8.0 e para avaliar diferenças entre os tratamentos foi realizada análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para comparação de médias ( $P < 0,05$ ). Os spots que apresentaram diferença

estatística foram recortados dos géis e encaminhados para identificação por espectrometria de massa (MS/MS) utilizando um Espectrometro ORBITRAP. A identificação das proteínas foi realizada utilizando o banco de dados NBCInc.

### 3.2.1.7 Identificação das proteínas por espectrometria de massa

Para a retirada do Comassie dos fragmentos de gel foram realizadas duas lavagens com  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (Ambic) 0,2M e  $\text{CH}_3\text{CN}$  (ACN) 0,1M 1:1, por 30 minutos em temperatura ambiente. Os fragmentos do gel foram então desidratados pela adição de 100  $\mu\text{L}$  acetonitrila (ACN) em temperatura ambiente e incubados por 10 minutos em temperatura ambiente, até a remoção completa do ACN. As proteínas foram reidratadas em Ambic 0,1 M por 30 min a  $56^\circ\text{C}$ . Os fragmentos de gel foram desidratados novamente com ACN e reidratados em Ambic 0,1 M no RT por duas vezes. Por último os fragmentos de gel foram reidratados novamente com ACN, que foi eliminado e as amostras foram secas em uma centrífuga à vácuo por 5 min. A digestão trípica foi realizada adicionando 10  $\mu\text{L}$  por amostra de solução de tripsina  $0,01 \mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$  em Ambic10mM /10% ACN, permitindo a absorção por 2 horas a  $4^\circ\text{C}$ . Após a amostra foi incubada *overnight* a  $37^\circ\text{C}$ . Quando a digestão trípica foi completada, os peptídeos foram extraídos dos pedaços de gel, duas vezes, com 100-150  $\mu\text{L}$  de ácido trifluoroacético 0,1% (TFA) / ACN 60% por 30 min a  $37^\circ\text{C}$  e finalmente reidratadas com 50-100  $\mu\text{L}$  ACN. Depois que o ACN foi completamente eliminado, 10  $\mu\text{L}$  de TFA 0,1% foi adicionado. Para as análises MALDI, 0,75  $\mu\text{L}$  das amostras foram misturadas com 0,75  $\mu\text{L}$  da solução matriz (solução saturada de ácido -cyano-4-hidroxycinnamic em 50% (v/v) ACN e 0,5% (v/v) de ácido trifluoroacético). Depois da aplicação da matriz, as amostras foram secas e as massas de peptídeo foram determinadas.

## 3.2.2 Proteoma da Solução do Solo

### 3.2.2.1 Descrição da área experimental:

Vasos de 75l e 0,5m diâmetro foram montados em fevereiro de 2007 com 3 camadas: 0,05m de cascalho seguidos de 0,22m de subsolo (25-50cm) e 0,25m de solo da camada superficial (0-25cm). A concentração total de

Cobre era de 1110mg Kg<sup>-1</sup> na camada superficial. Os tratamentos utilizados no solo para reduzir os teores de Cobre foram:

- 1) **CD**: 0,2% calcário dolomítico contendo 30% CaO e 20% MgO combinado com carbonatos;
- 2) **CO**: 5% composto derivado da compostagem (9-12 meses) de madeira com esterco de galinha;
- 3) **CDCO**: CD combinado com CO;
- 4) **ST**: solo sem tratamento;
- 5) **STSP**: solo sem tratamento e sem plantas.

Todos os tratamentos, exceto a testemunha sem plantas, foram cultivados com a gramínea *Agrostis gigantea* e com as espécies arbóreas *Populus trichocarpa* x *P. deltoides* cv. Beaupré. De cada vaso foram coletados dois litros de solução do solo que foram armazenados a 4°C por 30 dias antes da realização das análises. Na Tabela 02 estão apresentadas algumas características físico-químicas das amostras.

**Tabela 02-** Características físico-químicas das amostras de solução do solo.

Amostras	Cu* (mg l <sup>-1</sup> )	Carbono total (mg l <sup>-1</sup> )	pH	Condutividade	INH%
<b>ST**</b>	1,2	12,33	5,13	75,8	28,9
<b>STSP</b>	1,5	10,42	5,50	60,0	18,9
<b>CO</b>	0,9	12,81	5,56	111,9	22,5
<b>CD</b>	0,4	8,92	6,18	142,8	11,4
<b>CDCO</b>	0,6	5,35	5,74	161,9	9,6

\* média de três repetições \*\* ST- sem tratamento; STSP- sem tratamento e sem plantas; CO- composto orgânico; CD- calcário dolomítico; CDCO- composto orgânico e calcário dolomítico.

### 3.2.2.2 Contagem de microrganismos cultiváveis na solução do solo

Com objetivo de estimar a quantidade de microrganismos cultiváveis foi utilizada a técnica de diluição em série e inoculação em meio sólido das amostras de solução do solo (Lorch et al., 1995). As suspensões obtidas após

as diluições foram inoculadas em placas contendo meio mínimo mineral 284 contendo 0,2% de gluconato como fonte de carbono e 0,2% de ágar. As placas foram incubadas a 28°C e após 96 horas foi realizada a contagem das colônias. Paralelamente foi utilizado o mesmo meio de cultura suplementado com Cu 0,8mM para determinar o número de microrganismos cultiváveis resistentes a este elemento. Foi então calculada a porcentagem de microrganismos resistentes dividindo-se o número de resistente pelo número total de unidades formadoras de colônia.

#### 3.2.2.3 Extração, purificação, separação e análise das proteínas

Para a extração, 100ml de cada amostra foram concentrados até o volume de 0,5ml por ultra filtração. A extração, purificação, separação e análise das proteínas foram realizadas conforme descrito nos itens 3.1.5 e 3.1.6.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Seleção de Métodos para Avaliação da Qualidade Biológica do Solo

#### 4.1.1 Comparação de métodos para avaliação da biomassa microbiana do solo

Neste estudo foram testadas três metodologias amplamente utilizadas para avaliação do carbono da biomassa microbiana no solo: Fumigação-Incubação (FI), Fumigação-Extração (FE) e Respiração Induzida por Substrato (RIS).

Foi observada uma grande variação nos valores do carbono da biomassa microbiana entre os três métodos utilizados (Tabela 03). O local onde foi observada a maior variação foi em Tio Hugo na área de mata na segunda amostragem, variando de 173 a 825 mg C-CO<sub>2</sub> Kg<sup>-1</sup> solo seco para os métodos de Respiração Induzida por Substrato e Fumigação-Incubação respectivamente. A área onde foi observada a menor variação foi em Eldorado do Sul em solo sob eucalipto, com valores variando entre 412 e 492 mg C-CO<sub>2</sub> Kg<sup>-1</sup> solo seco.

A variação não foi observada somente com relação aos valores da biomassa entre os métodos, mas também na relação entre os valores nas áreas de referencia e nas áreas cultivadas (Tabela 03). Na amostragem realizada no verão, pelo método da fumigação-incubação houve uma redução de mais de 50% nos valores deste atributo na área cultivada em relação à área

nativa no município de Tio Hugo. Já pelo método da respiração induzida por substrato os valores praticamente não diferiram entre as áreas.

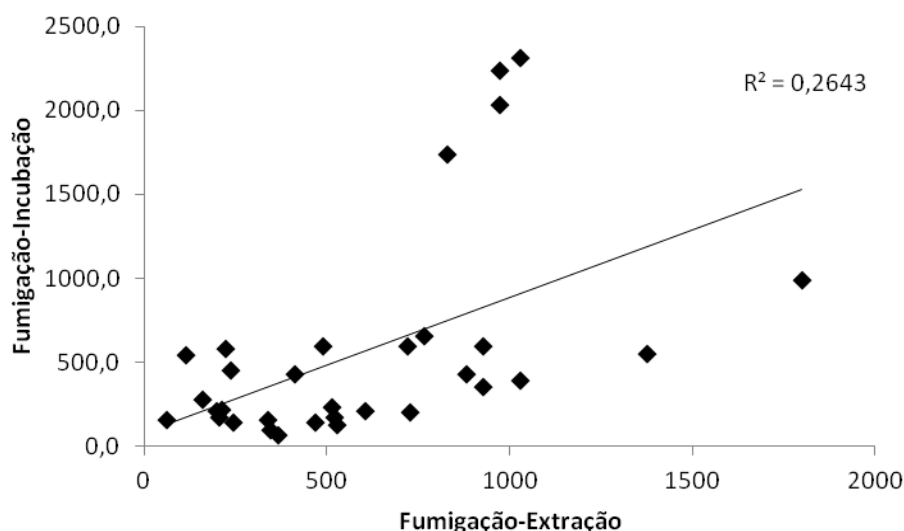
**Tabela 03:** Carbono da Biomassa Microbiana determinado por três diferentes metodologias em amostras de solo de diferentes locais sob diferentes usos.

ÁREA	Carbono da Biomassa Microbiana (mg C-CO <sub>2</sub> Kg <sup>-1</sup> solo seco)		
	FI**	FE	RIS
1° amostragem			
A1* mata	765	491	402
A1 PD	361	290	381
A2 campo	1122	841	629
A2 eucalipto	492	412	454
A3 mata	1675	391	842
A3 cana	347	187	113
2° amostragem			
A1* mata	569	825	173
A1 PD	204	592	264
A2 campo	571	1283	568
A2 eucalipto	115	381	302
A3 mata	2079	951	1033
A3 PD	542	267	473
A3 PC	168	178	355
A3 cana	262	329	675

\*A1- município de Tio Hugo; A2- município de Eldorado do Sul; A3 município de Londrina; PD- plantio direto soja/trigo; PC - plantio convencional soja/trigo.

\*\*FI - Fumigação-Incubação; FE . Fumigação-Extração; RIS . Respiração Induzida por Substrato.

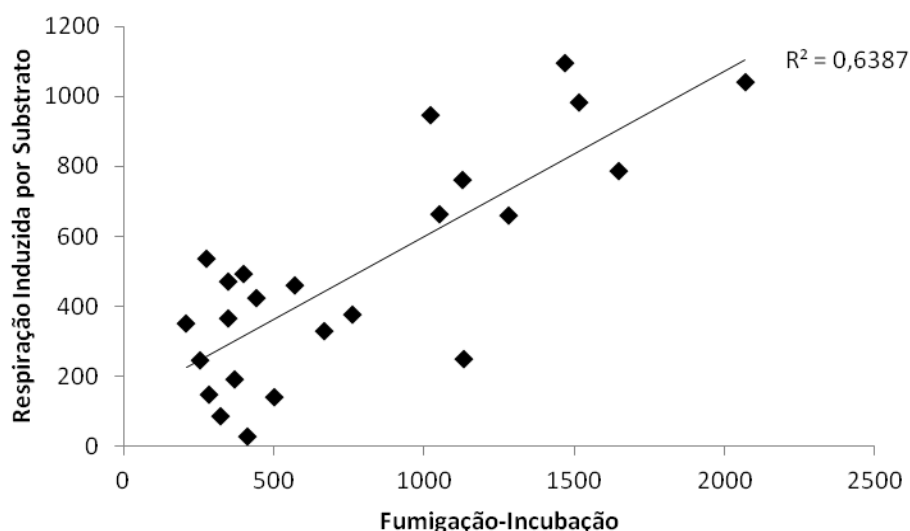
A Figura 04 representa um gráfico relacionando os valores de carbono da biomassa microbiana pelo método Fumigação-Incubação com os resultados do método da Fumigação-Extração (F-E). A correlação entre estes o métodos foi menor ( $r=0,45$ ) que a observada entre o método de Fumigação-Incubação e Respiração Induzida por Substrato (Tabela 04).



**Figura 04:** Relação entre valores do carbono da biomassa microbiana ( $\text{mg C-CO}_2 \text{ Kg}^{-1}$  solo seco) obtidos pelo método da Fumigação-Incubação e Fumigação-Extracção em solos de diferentes locais sob diferentes coberturas, amostrados em julho/2009.

A Figura 05 apresenta a relação entre os valores de carbono da biomassa microbiana determinado pelo método Fumigação-Incubação (F-I) com os resultados do método da Respiração Induzida por Substrato (RIS). Os dois métodos se correlacionaram positivamente na primeira amostragem ( $r=0,80$ ) e esta relação se manteve também na segunda amostragem ( $r=0,71$ ). É importante salientar que ambos os métodos utilizam a quantificação do  $\text{C-CO}_2$  liberado do solo para estimar o carbono da biomassa. Este tipo de metodologia depende da atividade da microbiota presente no solo, pois será esta população que irá utilizar e liberar o carbono da biomassa morta na forma de  $\text{CO}_2$ . Diferentemente do Método da Fumigação-Extracção, onde o fluxo de carbono é determinado por extração química pela solução de  $\text{K}_2\text{SO}_4$ .

Lin & Brookes (1996) trabalhando com solos com diferentes características físico-químicas testaram três métodos para determinação da biomassa microbiana: Fumigação-Extracção (FE), Respiração Induzida por Substrato (RIS) e Conteúdo de ATP. Estes autores encontraram valores de coeficiente de correlação ( $r$ ) maiores que o do presente estudo, variando de 0,63 a 0,68. Cabe salientar que foram avaliados 13 diferentes solos, enquanto que no presente estudo foram apenas três diferentes solos.



**Figura 05:** Relação entre valores do carbono da biomassa microbiana ( $\text{mg C-CO}_2 \text{ Kg}^{-1}$  solo seco) obtidos pelo método da Fumigação-Incubação e Respiração Induzida por Substrato em solos de diferentes locais sob diferentes coberturas amostrados em janeiro/2009.

**Tabela 04:** Coeficientes de correlação ( $r$ ) entre métodos para determinação do carbono da biomassa microbiana em amostras de solo de diferentes locais sob diferentes coberturas em duas épocas de amostragem.

	F-I	F-E	RIS
Verão/2009			
F-I*	1,00	---	---
F-E	0,45	1,00	---
RIS	0,80	0,44	1,00
Inverno/2009			
F-I	1,00	---	---
F-E	0,51	1,00	---
RIS	0,71	0,32	1,00

\*F-I: Fumigação-Incubação; F-E: Fumigação-Extração; RIS: Respiração Induzida por Substrato

Após a avaliação dos resultados obtidos nesse estudo optou-se por adotar o método da Fumigação-Incubação, diferentemente do sugerido por Andréa & Hollweg (2004). Estes autores testaram dois métodos para a quantificação do carbono da biomassa microbiana, FE e RIS, com diferentes variações nos extratores utilizados e nos cálculos adotados. Com base nos resultados obtidos estes autores sugeriram a adoção do método da Fumigação Extração na

avaliação do carbono da biomassa, com a utilização da fórmula matemática de Vance et al. (1987) para os cálculos.

A decisão de adotar o método da Fumigação Incubação é porque é um método simples e de baixo custo. Além disso, é possível utilizar as amostras não fumigadas para a determinação da taxa de respiração microbiana. Cabe salientar também que com este método foi possível diferenciar todas as áreas avaliadas. Diferentemente do que ocorreu para os outros dois métodos testados, que apresentaram uma alta variabilidade nos valores entre as repetições, não possibilitando assim diferenciar algumas áreas.

#### 4.1.2 Atributos biológicos de solos sob diferentes usos

Em Eldorado do Sul, na primeira amostragem, dos seis parâmetros avaliados também quatro foram estatisticamente inferiores na área cultivada em relação à área nativa (Tabela 05). Foram eles: biomassa microbiana, respiração basal, hidrólise do diacetato de fluoresceína e Índice de Shannon. Já na segunda amostragem cinco parâmetros foram estatisticamente inferiores na área sob eucalipto (Tabela 06), sendo que apenas não foram observadas diferenças entre as áreas nos valores de N mineralizado.

**Tabela 05:** Atributos biológicos de Argissolo Vermelho distrófico típico sob campo nativo e eucalipto, na camada de 0-10cm, no município de Eldorado do Sul (RS), em amostras coletadas em janeiro de 2009.

Avaliação	Tipo de cobertura	
	Campo	Eucalipto
Biomassa Microbiana F-I (mg C-CO <sub>2</sub> Kg <sup>-1</sup> solo seco)	1122,3 a*	492,3 b
Respiração (mg C-CO <sub>2</sub> Kg <sup>-1</sup> solo seco)	234,0 a	122,2 b
N mineralizado (mg NH <sub>4</sub> Kg <sup>-1</sup> solo seco)	11,4 a	10,31 a
Hidrólise DAF (µg F g <sup>-1</sup> solo seco h <sup>-1</sup> )	160,7 a	137,0 b
Desidrogenase (µg TPF g <sup>-1</sup> solo seco)	38,0 a	18,4 a
Índice de Shannon	7,62 a	6,11 b

\*Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

A maior biomassa e atividade microbiana na área de campo nativo em relação à reflorestada podem ser explicadas pelo tipo de cobertura desse solo. No campo há um predomínio de gramíneas, e estas espécies apresentam o sistema radicular concentrado na camada mais superficial do solo em relação ao eucalipto, e conseqüentemente uma maior rizosfera nessa profundidade. Sabe-se que esta região favorece o desenvolvimento dos microrganismos devido à liberação de exudados pelas raízes das plantas (Moreira & Siqueira, 2006). Nas áreas cultivadas com eucalipto também há um aporte constante de resíduos vegetais para o solo, mas estes resíduos tendem a ser mais lignificados e de mais difícil decomposição (Gama-Rodrigues & Barros, 2002).

**Tabela 06:** Atributos biológicos de Argissolo Vermelho distrófico típico sob campo nativo e eucalipto, na camada de 0-10cm, no município de Eldorado do Sul (RS), em amostras coletadas em julho de 2009.

Avaliação	Tipo de cobertura	
	Campo	Eucalipto
Biomassa Microbiana F-I (mg C-CO <sub>2</sub> Kg <sup>-1</sup> solo seco)	570,8 a	114,9 b
Respiração (mg C-CO <sub>2</sub> Kg <sup>-1</sup> solo seco)	241 a	84,3 b
N mineralizado (mg NH <sub>4</sub> Kg <sup>-1</sup> solo seco)	43,5 a	17,9 a
Hidrólise DAF (µg F g <sup>-1</sup> solo seco h <sup>-1</sup> )	182 a	90 b
Desidrogenase (µg TPF g <sup>-1</sup> solo seco)	45 a	11,2 b
Índice de Shannon	7,44 a	6,03 b

\*Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

Com relação à diversidade observou-se que a área cultivada com eucalipto apresentou menor índice de Shannon em relação à área sob campo nativo (Tabelas 05 e 06), indicando uma possível perda de diversidade metabólica no solo sob cultivo de eucalipto. Áreas de campo nativo possuem uma maior diversidade florística quando comparada a áreas de eucalipto, favorecendo uma maior diversidade de microrganismos. O maior valor do índice observado na área sob campo nativo reforça a idéia que de os resíduos

adicionados ao solo neste ambiente são mais diversificados em relação aos resíduos da área de eucalipto. Lisboa et al. (2008) trabalhando com o mesmo solo deste estudo, mas comparando diferentes coberturas em plantio direto, não observou diferenças entre os índices de diversidade dos sistemas avaliados com o campo nativo. Cabe salientar que as culturas estudadas por estes autores são anuais, enquanto que o eucalipto é uma espécie perene, portanto a dinâmica nos solos é diferente.

Dos atributos biológicos avaliados na primeira amostragem no município de Tio Hugo, quatro apresentaram valores estatisticamente menores na área cultivada em relação à área de vegetação nativa (Tabela 07). O solo sob cultivo de soja/trigo apresentou menores valores de biomassa microbiana, respiração basal, desidrogenase e mineralização do N em relação ao solo sob mata nativa. Na segunda amostragem (Tabela 08) foram observadas diferenças estatísticas também em quatro parâmetros, biomassa microbiana, respiração basal, hidrólise do DAF e mineralização do N, com redução significativa na área cultivada em relação à área de vegetação nativa.

**Tabela 07:** Atributos biológicos de Latossolo Vermelho distrófico sob mata nativa e plantio direto soja/trigo, na camada de 0-10cm, no município de Tio Hugo (RS), em amostras coletadas em janeiro de 2009.

Avaliação	Tipo de cobertura	
	Mata	PD*
Biomassa Microbiana F-I (mg C-CO <sub>2</sub> Kg <sup>-1</sup> solo seco)	765,2 a**	361,4 b
Respiração (mg C-CO <sub>2</sub> Kg <sup>-1</sup> solo seco)	234,0 a	122,2 b
N mineralizado (mg NH <sub>4</sub> Kg <sup>-1</sup> solo seco)	28,4 a	11,8 b
Hidrólise DAF (µg F g <sup>-1</sup> solo seco h <sup>-1</sup> )	240,17 a	237,7 a
Desidrogenase (µg TPF g <sup>-1</sup> solo seco)	57,1 a	32,7 b
Índice de Shannon	7,22 a	7,06 a

\*PD- plantio direto soja/trigo

\*\*Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

**Tabela 08:** Atributos biológicos de Latossolo Vermelho distrófico sob mata nativa e plantio direto soja/trigo, na camada de 0-10cm, no município de Tio Hugo (RS), em amostras coletadas em julho de 2009.

Avaliação	Tipo de cobertura	
	Mata	PD*
Biomassa Microbiana F-I (mg C-CO <sub>2</sub> Kg <sup>-1</sup> solo seco)	569,4 a**	204,0 b
Respiração (mg C-CO <sub>2</sub> Kg <sup>-1</sup> solo seco)	349,0 a	124 b
N mineralizado (mg NH <sub>4</sub> Kg <sup>-1</sup> solo seco)	65,7 a	30,6 b
Hidrólise DAF (µg F g <sup>-1</sup> solo seco h <sup>-1</sup> )	153 a	125 b
Desidrogenase (µg TPF g <sup>-1</sup> solo seco)	29,3 a	11,7 a
Índice de Shannon	6,93 a	6,10 a

\*PD- plantio direto soja/trigo

\*\*Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

Em Londrina na primeira amostragem todos os parâmetros avaliados foram estatisticamente inferiores na área cultivada com cana-de-açúcar em relação à área de vegetação nativa (Tabela 09). Na segunda amostragem optou-se por incluir mais duas áreas com características de manejo de solo intermediárias entre as áreas de vegetação nativa e de cana-de-açúcar. Dos seis parâmetros biológicos avaliados cinco apresentaram diferença estatística entre as áreas cultivadas e sob vegetação nativa (Tabela 10). O solo sob cana apresentou reduções significativas em praticamente todos os parâmetros.

No município de Londrina quando a área de vegetação nativa foi considerada junto com as áreas cultivadas na análise de variância, não foi possível distinguir os efeitos das diferentes culturas e manejos no solo através do teste de comparação de médias (Tukey) ao nível de significância de 5%. Isso ocorreu devido aos altos valores de todos os parâmetros na área de referência. Por isso foi realizada uma comparação apenas entre as áreas cultivadas e desta forma foi possível visualizar o efeito dos diferentes cultivos e manejo nos parâmetros biológicos (Tabela11).



**Tabela 09:** Atributos biológicos de Latossolo Vermelho distroférico sob mata nativa e cana de açúcar, na camada de 0-10cm, no município de Londrina (PR), em amostras de solo coletadas em janeiro de 2009.

Avaliação	Tipo de cobertura	
	Mata	Cana
Biomassa Microbiana F-I (mg C-CO <sub>2</sub> Kg <sup>-1</sup> solo seco)	1675,3 a	347,3 b
Respiração (mg C-CO <sub>2</sub> Kg <sup>-1</sup> solo seco)	593,2 a	123,5 b
N mineralizado (mg NH <sub>4</sub> Kg <sup>-1</sup> solo seco)	78 a	9,7 b
Hidrólise DAF (µg F g <sup>-1</sup> solo seco h <sup>-1</sup> )	170,6 a	45,9 b
Desidrogenase (µg TPF g <sup>-1</sup> solo seco)	118,1 a	26,5 b
Índice de Shanonn	7,01 a	5,89 b

\*Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

**Tabela 10:** Atributos biológicos de Latossolo Vermelho distroférico sob mata nativa, cana de açúcar, plantio direto soja/trigo e plantio convencional, na camada de 0-10cm, no município de Londrina (PR), em amostras de solo coletadas em julho de 2009.

Avaliação	Tipo de cobertura			
	Mata	Cana	PD	PC
Biomassa Microbiana F-I (mg C-CO <sub>2</sub> Kg <sup>-1</sup> solo seco)	2079 a	262 bc	542 b	168 c
Respiração (mg C-CO <sub>2</sub> Kg <sup>-1</sup> solo seco)	430,9 a	56,8 b	94,9 b	79,5 b
N mineralizado (mg NH <sub>4</sub> Kg <sup>-1</sup> solo seco)	148,4 a	16,8 b	29,2 b	4,9 b
Hidrólise DAF (µg F g <sup>-1</sup> solo seco h <sup>-1</sup> )	79 ab	58 b	106 a	73 ab
Desidrogenase (µg TPF g <sup>-1</sup> solo seco)	90,2 a	8,9 b	23,4 b	14,3 b
Índice de Shanonn	6,94 a	6,62 a	6,39 a	6,61 a

\*PD- plantio direto soja/trigo; PC- plantio convencional soja/trigo

\*\*Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

**Tabela 11:** Atributos biológicos de Latossolo Vermelho distroférico sob cana de açúcar, plantio direto soja/trigo e plantio convencional soja/trigo, na camada de 0-10cm, no município de Londrina (PR), em amostras de solo coletadas em julho de 2009.

Avaliação	Tipo de cobertura		
	PD	PC	Cana
Biomassa Microbiana F-I (mg C-CO <sub>2</sub> Kg <sup>-1</sup> solo seco)	542 a*	168 b	262 b
Respiração (mg C-CO <sub>2</sub> Kg <sup>-1</sup> solo seco)	94,9 a	79,5 a	56,8 a
N mineralizado (mg NH <sub>4</sub> Kg <sup>-1</sup> solo seco)	29,2 a	4,9 b	16,8 b
Hidrólise DAF (µg F g <sup>-1</sup> solo seco h <sup>-1</sup> )	106 a	73 ab	58 b
Desidrogenase (µg TPF g <sup>-1</sup> solo seco)	23,4 a	14,3 ab	8,9 b
Índice de Shanonn	6,39 a	6,61 a	6,62 a

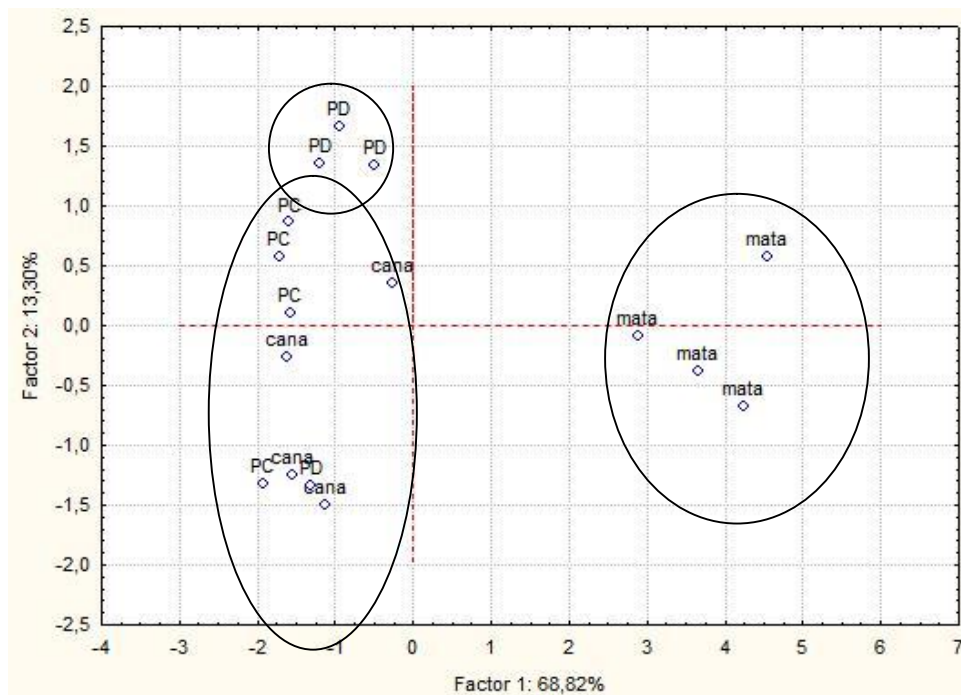
\*PD- plantio direto soja/trigo; PC- plantio convencional soja/trigo

\*\*Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

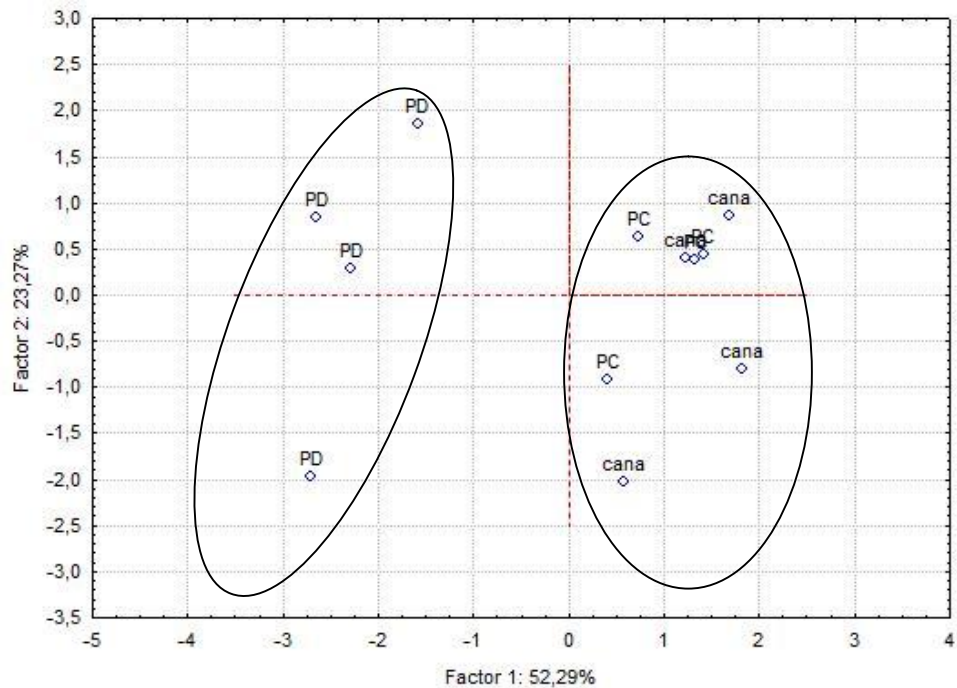
Além disso, para facilitar a visualização, foi realizada a Análise de Componentes Principais, que considera duas ou mais variáveis em conjunto para agrupar ou distinguir tratamentos. Para esta análise foram consideradas a Biomassa Microbiana, Respiração Basal, Hidrólise DAF, Desidrogenase e Índice de Shannon. Na figura 06 a análise foi realizada considerando todas as áreas em Londrina (cultivadas e mata nativa), e na Figura 07 foram comparadas apenas as áreas sob cultivo.

Outros autores também observaram maiores valores de biomassa e atividade microbiana em áreas sob vegetação nativa quando comparadas com áreas cultivadas (Matsuoka et al, 2003; Costa et al., 2006; Mijangos et al., 2006). Diversos fatores contribuem para uma maior biomassa e atividade microbiana nas áreas nativas, como a ausência de preparo de solo, adição contínua de resíduos, melhor distribuição do sistema radicular e a maior diversidade florística (Bandick & Dick, 1999). Segundo Moreira & Siqueira (2006) solos sob interferência antrópica, como é o caso das áreas cultivadas, apresentam mudanças na sua composição e em atividades metabólicas específicas, uma vez que a população microbiana é submetida a um estresse.

O solo sob plantio direto foi o que apresentou os maiores valores para praticamente todos os parâmetros (Tabela11). Somente não foram observadas diferenças na Respiração Basal e no Índice de Shannon. Já o solo sob plantio convencional apresentou valores mais próximos ao da área sob cana-de açúcar (Figura 07). Tanto o plantio convencional quanto o cultivo de cana-de açúcar envolvem técnicas de preparo de solo que possuem efeito negativo sobre a microbiota deste ambiente, como o revolvimento do solo e o uso de queimadas no caso da cana.



**Figura 06:** Gráfico de ordenação após a Análise de Componentes principais dos atributos biológicos de Latossolo Vermelho distroférrico sob mata nativa, cana-de-açúcar, plantio direto soja/trigo (PD) e plantio convencional soja/trigo (PC).



**Figura 07:** Gráfico de ordenação após a Análise de Componentes principais dos atributos biológicos de Latossolo Vermelho distroférrico sob cana-de-açúcar, plantio direto soja/trigo (PD) e plantio convencional soja/trigo (PC).

De todos os parâmetros avaliados o Carbono da Biomassa Microbiana foi o que mais respondeu aos diferentes usos do solo. Este atributo já foi utilizado por diversos autores em estudos de qualidade do solo (Mendes et al., 2003; Casalinho, 2003; Schmitz, 2003; Matsuoka, 2005; Costa et al., 2006). Essa escolha se deve a algumas características da biomassa, como a rápida reciclagem em relação a MO do solo (Paul, 1984), por conseguir integrar propriedades químicas e físicas e por responder aos diferentes usos e às alterações de manejo. É importante ressaltar que este parâmetro é diretamente dependente da temperatura e da disponibilidade de resíduos orgânicos, podendo variar em função do clima e da cobertura vegetal do solo em um determinado momento.

A Respiração Basal apresentou um bom desempenho na diferenciação das áreas nativas das cultivadas, mas não apresentou diferenças significativas entre os solos cultivados. Cabe salientar que a respiração microbiana também ser considerada com cautela, já que mínimos distúrbios costumam influenciar na atividade respiratória do solo, não indicando necessariamente que este comportamento da microbiota irá perdurar. Mas ainda sim por ser um método simples e econômico é utilizada por diversos

pesquisadores em estudos de qualidade do solo (Mijangos et al., 2006; Costa et al., 2006).

Apesar da tendência de maiores valores nas áreas de vegetação nativa em Eldorado do Sul o N mineralizado não foi capaz de diferir as áreas de referência das áreas cultivadas. Apesar disso a mensuração do potencial de mineralização do N também é extremamente relevante e deve ser considerada em conjunto com as outras medidas de atividade. Isso devido à relação deste processo com a capacidade do solo de fornecer N para o crescimento das plantas (Canali e Benedetti, 2006).

Com base nos resultados deste estudo, a hidrólise do diacetato de fluoresceína (DAF) foi sensível em detectar diferenças em todas as áreas avaliadas em ao menos uma época do ano. Diversos pesquisadores têm utilizado a avaliação deste parâmetro como uma medida da atividade microbiana do solo, sendo capaz de detectar alterações no manejo do solo (Bandick & Dick, 1999; Haynes & Tregurtha, 1999). Stark et al. (2008) observaram diferenças significativas na hidrólise do DAF quando compararam dois manejos de solo, orgânico e convencional. Estes autores ainda observaram que a hidrólise do DAF se correlacionava positivamente com a atividade da desidrogenase.

A atividade da desidrogenase reflete a atividade oxidativa total da microflora do solo e pode ser um bom indicador da atividade microbiana (Nannipieri et al., 1990). No caso do presente estudo este parâmetro nem sempre foi capaz de diferir estatisticamente as áreas cultivadas das áreas de referência, apesar da tendência de maiores valores nas áreas de vegetação nativa. Um dos motivos para esse comportamento é a alta variabilidade observada entre as repetições, mesmo com a utilização de quatro réplicas de campo mais três réplicas analíticas. Resultados obtidos por Mastro et al. (2006) indicam que a atividade da desidrogenase pode não ser um índice confiável da atividade microbiana para solos quando as taxas de adubação nitrogenada estão acima das doses recomendadas, porque os nitratos diminuem a atividade

desta enzima. Por isso também a interpretação dos resultados desse parâmetro deve ser realizada com cautela.

Com relação à diversidade metabólica, representada pelo Índice de Shannon, para a maioria dos locais estudados não foram observadas diferenças significativas. Estes resultados indicam que, para estas condições, este parâmetro não foi útil para distinguir diferenças na qualidade biológica do solo. Ao contrário de Bending et al. (2000) que consideram o perfil de utilização de substratos pelos microrganismos um parâmetro mais sensível do que a medição da biomassa para avaliar alterações em função do manejo e uso do solo. É necessário levar em conta as limitações deste método, que é dependente do crescimento de células bacterianas, e que ainda apenas bactérias heterotróficas aeróbicas e anaeróbicas facultativas de rápido crescimento e que não são inibidas pela presença do sal tetrazólio poderão utilizar os substratos do sistema (O'Connell et al., 2000). Segundo Konopka et al. (1998) outro fator importante a ser considerado é que este tipo de metodologia não é sensível para detectar mudanças na estrutura da população. Isso ocorre em consequência da redundância metabólica em comunidades, ou seja, muitas espécies têm o potencial genético para a utilização de um determinado substrato. Por outro lado um solo após anos sendo cultivado ainda apresenta o mesmo índice de riquezas de substratos próximo de uma área nativa pode indicar uma boa resiliência deste ambiente.

#### 4.1.3 Representação integrativa dos atributos biológicos do solo

As variações observadas nos parâmetros biológicos avaliados neste estudo, assim como as limitações dos métodos empregados, só confirmam a necessidade de estes serem considerados em conjunto para uma avaliação mais realista e satisfatória da qualidade biológica do solo. Por isso os dados foram integrados graficamente (Figuras 8, 9 e 10) e através de um índice numérico (Tabela 12).

Os gráficos radiais que representam as integrações dos atributos biológicos dos solos dos municípios de Tio Hugo, Eldorado do Sul e Londrina em duas épocas de amostragem estão apresentados nas figuras 8, 9 e 10

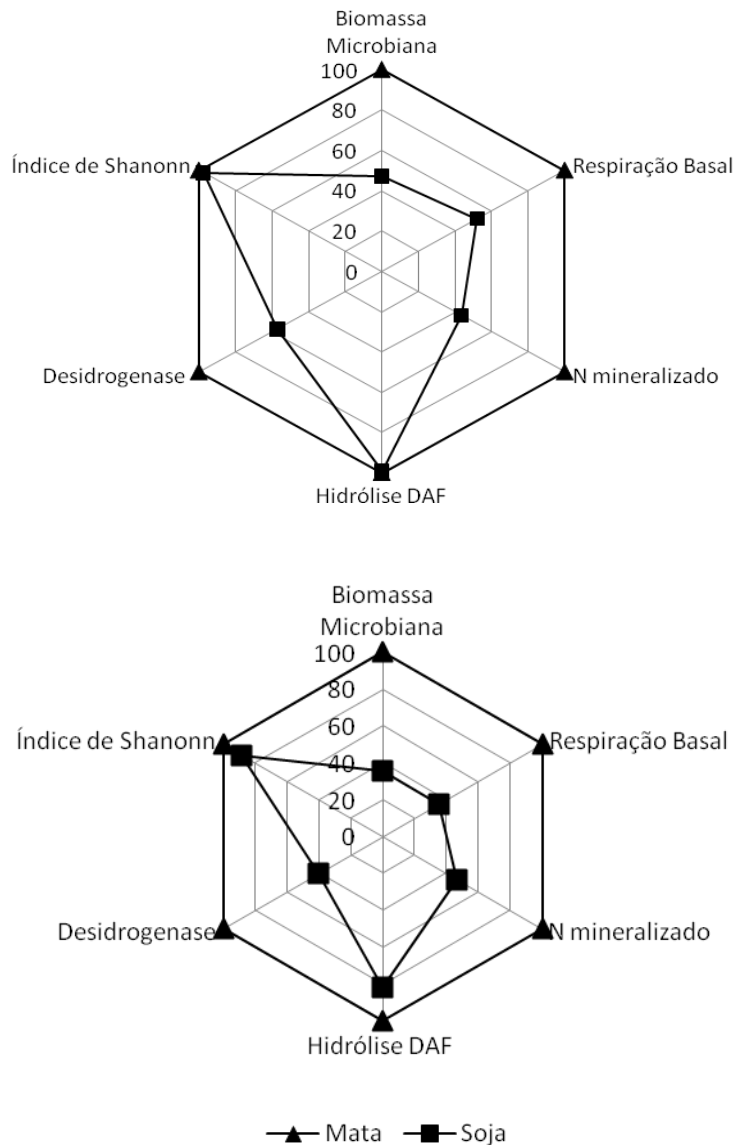
respectivamente. Neste tipo de gráfico, os resultados da biomassa microbiana, respiração basal, N mineralizado, hidrólise do diacetato de fluoresceína, desidrogenase e índice de Shannon estão dispostos em eixos específicos com origem comum. Os valores para cada área cultivada são apresentados com uma porcentagem dos resultados verificados na área de referência (mata ou campo nativo), que representa 100%. Estes resultados são ligados entre si, formando um polígono específico para cada área, seguindo a metodologia de Schmitz (2003).

Na Figura 8 é possível observar que no município de Tio Hugo, para as duas épocas de amostragem, as formas do polígono da área cultivada com soja foram bem semelhantes. Mas no verão observou-se que os valores dos atributos tendem a ficar mais próximos da área de referência. Os valores de biomassa microbiana e respiração basal foram quase 50% menores na área cultivada em relação à nativa na primeira amostragem, e na segunda avaliação essa redução foi de 36%. A atividade da desidrogenase também apresentou um menor valor relativo na segunda amostragem. Já o potencial de mineralização do nitrogênio não apresentou variação no valor relativo entre as amostragens.

No município de Eldorado todos os parâmetros foram menores na área com eucalipto em relação à área sob campo nativo nas duas amostragens (Figura 09). Este comportamento, no entanto, não se deu de maneira uniforme. Em julho/2009 houve uma grande redução nos valores de atividade microbiana na área com eucalipto em relação à área nativa, sendo que na amostragem realizada no verão os valores do N mineralizado e hidrólise do diacetato de fluoresceína eram quase iguais aos da área de referência. Apenas o Índice de Shannon não teve uma grande alteração entre as épocas.

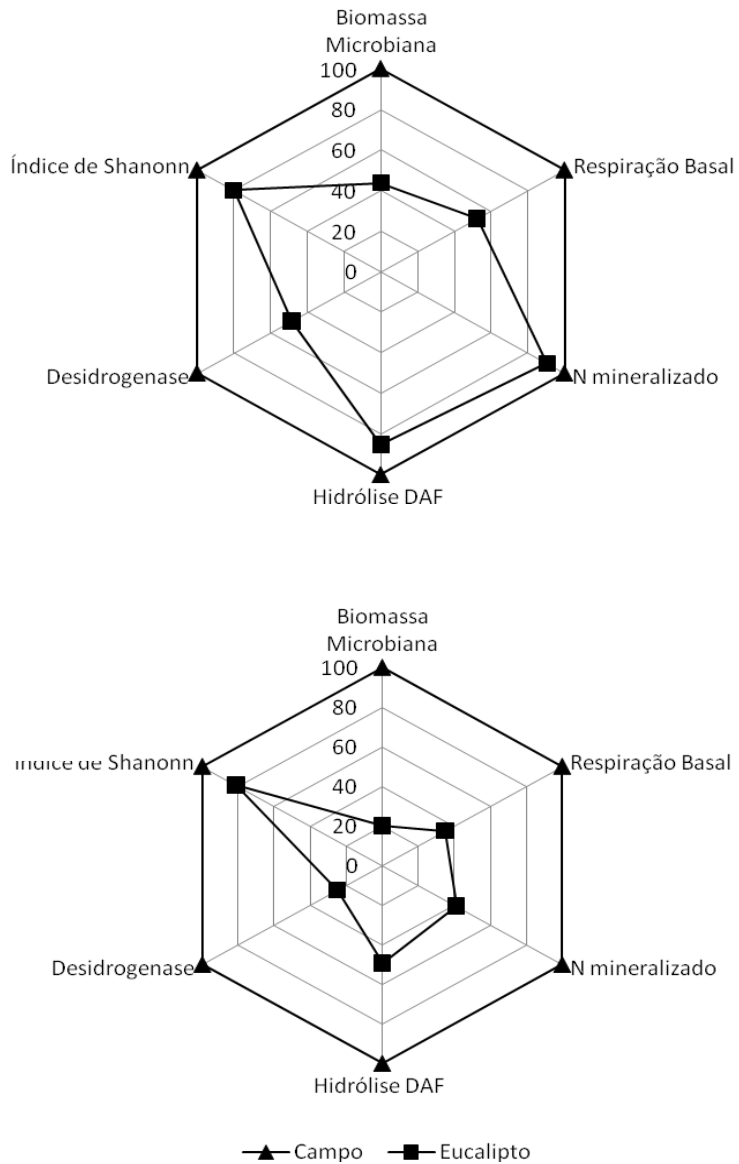
No município de Londrina (Figura 10) foi observado que na primeira amostragem os valores dos atributos biológicos na área cultivada com cana-de-açúcar foram expressivamente menores que os da área de referência, sendo que a maioria dos atributos tiveram valores correspondendo a apenas 20% dos encontrados na área sob mata nativa. Na segunda amostragem a área com cana apresentou um comportamento semelhante para quase todos os indicadores, exceto para a hidrólise do diacetato de fluoresceína que chegou a

73% do valor encontrado na área de referência. Este atributo apresentou comportamento semelhante em todas as áreas cultivadas, sendo que na área sob plantio direto foi maior que na área de referência.

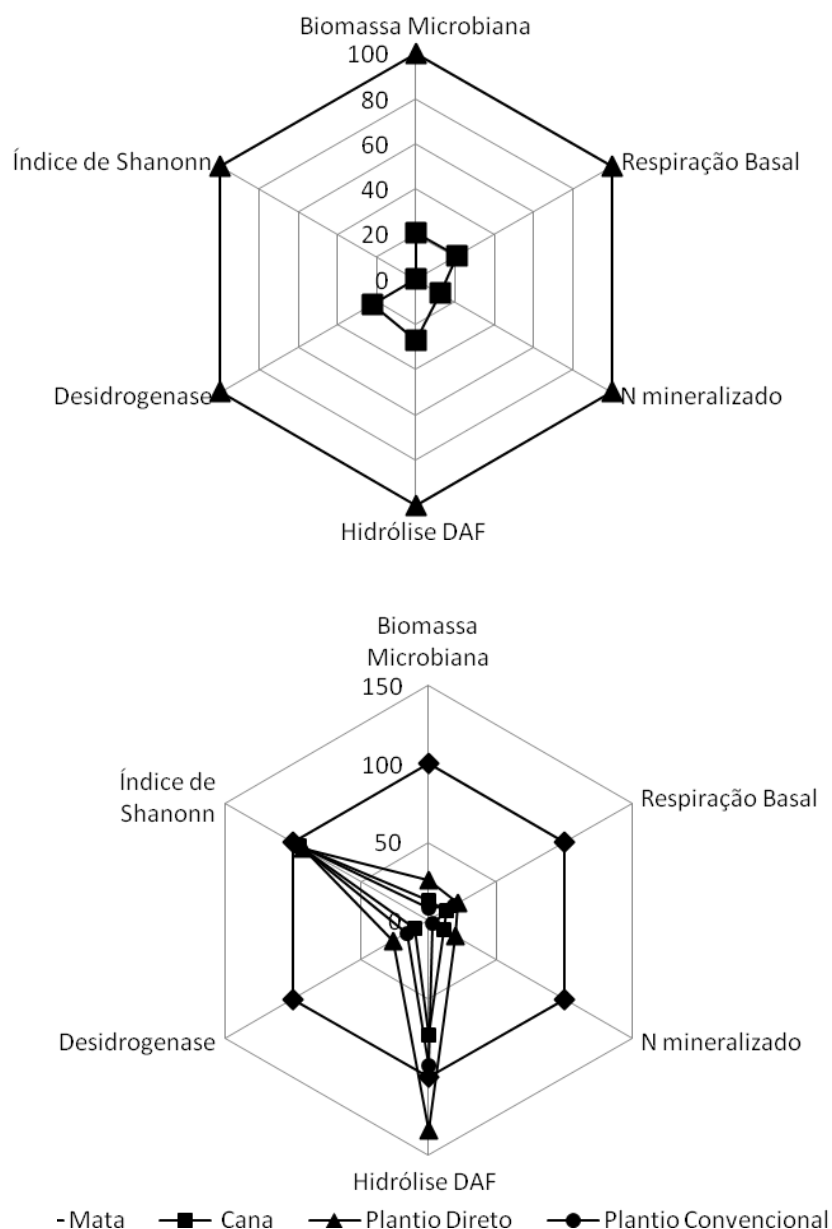


**Figura 08:** Representação integrativa (%) dos atributos biológicos de Latossolo Vermelho distrófico, sob lavoura de soja e mata nativa como referência, da profundidade de 0-10 cm, em duas épocas de amostragem: verão (acima) e inverno (abaixo), no município de Tio Hugo.





**Figura 09:** Representação interativa (%) dos atributos biológicos de Argissolo Vermelho distrófico típico, sob campo nativo e eucalipto como referência, da profundidade de 0-10cm, em duas épocas de amostragem: verão (acima) e inverno (abaixo).



**Figura 10:** Representação interativa (%) dos atributos biológicos de Latossolo Vermelho distroférico sob mata nativa, cana de açúcar, plantio direto e plantio convencional, da profundidade de 0-10cm, em duas épocas de amostragem: verão (acima) e inverno (abaixo).

Para a integração numérica dos resultados foi adotado um índice baseado no Índice Biológico de Qualidade do Solo (IBQS) sugerido por Schmitz (2003). Este índice considera os desempenhos relativos dos atributos avaliados em relação a uma área de referência de vegetação nativa e para compô-lo foram utilizados os mesmos parâmetros representados nos gráficos radiais (Figuras 8, 9 e 10).

Quando todos os parâmetros foram representados por este índice numérico (Tabela 12) ficou mais simples comparar as áreas e também as épocas de amostragem. Os valores dos índices nas áreas cultivadas variaram de 31 a 67 nas amostras de solo coletadas em janeiro, e de 36 a 55 nas coletadas em julho. Fica claro que durante o verão as características biológicas das áreas cultivadas ficam mais próximas das áreas nativas nas amostras coletados em Eldorado e Tio Hugo.

**Tabela 12:** Índice de Qualidade Biológica de solos sob diferentes usos, em duas épocas do ano.

Local	1ª amostragem	2ª amostragem
<b>Tio Hugo</b>		
Mata	100	100
Soja	66	55
<b>Eldorado do Sul</b>		
Campo	100	100
Eucalipto	67	42
<b>Londrina</b>		
Mata	100	100
Cana de açúcar	31	36
Plantio Direto	---	53
Plantio Convencional	---	39

Schmitz (2003) avaliou o efeito de diferentes coberturas em um Argissolo sob plantio direto através do IBQS. Para a construção deste índice ele considerou os seguintes parâmetros: biomassa microbiana, respiração basal, e as atividades de cinco enzimas ( -glucosidade, fosfatase ácida, urease, amidase e aril-sulfase). Os valores encontrados por este autor variaram de 32 a 64. É interessante observar que mesmo compondo o índice com alguns atributos diferentes do presente estudo, os valores observados nas áreas cultivadas foram semelhantes aos observados neste trabalho.

As diferenças entre os manejos e usos empregados nos três solos cultivados em Londrina também podem ser visualizadas, e a área de plantio direto soja/trigo foi a que apresentou o maior valor do índice de qualidade, seguidas do plantio convencional soja/trigo e com pior desempenho foi a área

cultivada com cana-de-açúcar. As práticas de manejo que são empregadas no sistema plantio direto, como a ausência de revolvimento e manutenção da camada vegetal, favorecem a microbiota. Enquanto que nas áreas com cultivo de cana-de-açúcar e plantio convencional soja/trigo o solo é revolvido com arado de disco e com uma ou duas gradagens leves. Estas práticas têm efeito negativo na microbiota do solo. Além disso, na área de cana-de-açúcar o método empregado para colheita é o tradicional, com a queima das plantas. Esta prática apesar de ter um efeito positivo imediato na biomassa e atividade microbiana pela liberação de nutrientes dos resíduos orgânicos, não é benéfica ao longo do tempo, pois diminui os níveis de matéria orgânica do solo. Cabe ainda salientar que as áreas de plantio direto e convencional estão sob esses sistemas há 31 anos, enquanto que área com cana-de-açúcar é cultivada com essa cultura há 16 anos.

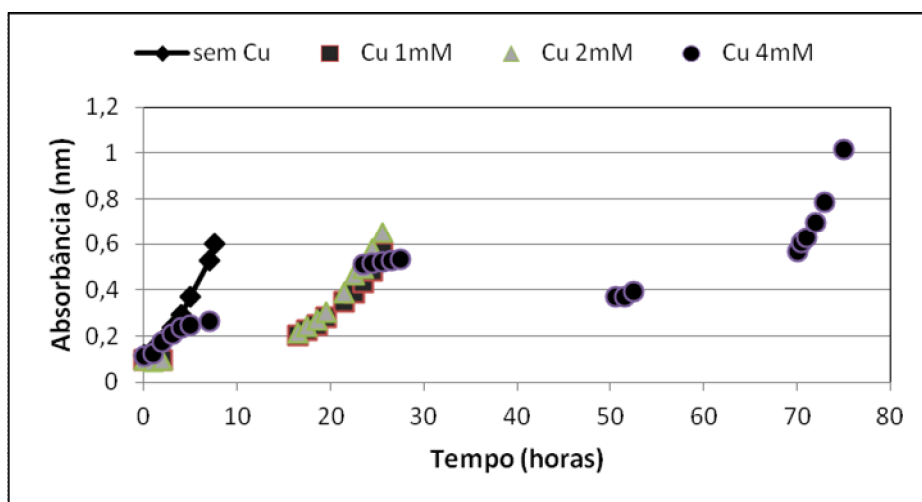
A utilização do índice numérico junto com a representação gráfica integrativa facilita a visualização e o entendimento da situação em que se encontra o solo. Permite ainda visualizar quais parâmetros estão sendo mais afetados por determinado uso ou condição do solo, e assim determinar que práticas podem ser empregadas para corrigi-lo. As diferenças nos valores dos atributos verificadas para os diferentes locais avaliados não quer dizer que naqueles locais onde os valores são mais altos o solo apresenta maior qualidade. É necessário considerar a potencialidade de cada solo, por isso a importância da avaliação concomitante da vegetação nativa. Mas a comparação com áreas de referencia, ainda que necessária, deve ser interpretada com cautela. A análise dos dados obtidos deixa evidente o grande impacto do cultivo nas propriedades biológicas originais dos solos. Mesmo a utilização de uma prática que é considerada conservacionista (plantio direto) reduziu consideravelmente os valores dos atributos biológicos. Mas deve-se considerar que quando o equilíbrio de um solo sob vegetação nativa é rompido um novo equilíbrio é restabelecido.

## 4.2 Proteoma do solo e da solução do solo contaminado com cobre

### 4.2.1 Proteoma do Solo

#### 4.2.1.1 Curvas de crescimento do *C. metallidurans* CH34

Em condições de crescimento normal (sem metal) a bactéria atinge a fase log em apenas 5 horas (Figura 11). Na presença de Cobre 1 mM e 2 mM a dinâmica de crescimento foi semelhante, chegando a fase log nestas concentrações após quase 20 horas. Já em uma concentração maior de Cobre (5 mM) o crescimento foi mais lento, chegando a fase exponencial somente após 70 horas.



**Figura 11:** Curvas de crescimento de *C. metallidurans* CH34 em meio mineral com e sem adição de cobre.

Mesmo os microrganismos que apresentam resistência a metais quando em contato com estes elementos necessitam de uma fase latente maior para ativar mecanismos que permitam sua adaptação a estas condições, por isso o maior tempo para alcançar a fase exponencial do que em condições normais. Os mecanismos utilizados pelas bactérias resistentes ao Cobre incluem a redução do transporte do íon metálico para dentro das células, a complexação pelos componentes celulares e o aumento do efluxo dos íons cúpricos (Cervantes e Corona, 1994).

#### 4.2.1.2 Viabilidade do *C. metallidurans* CH34 no solo

Foi realizado um estudo para determinar a viabilidade do organismo indicador após a sua adição nos solos contaminados com Cobre, com e sem tratamento de remediação. Esse dado é importante para determinar o tempo que esta bactéria seria incubada com o solo antes da extração do proteoma, permitindo que ela expressasse alterações no seu proteoma em resposta às condições destes ambientes.

O número de unidades formadoras de colônia dos solos inoculados aumentou após dois dias de incubação em todos os tratamentos (Tabela 13). Após este período o número de células começou a diminuir em alguns tratamentos, e após 10 dias todos os tratamentos apresentaram uma biomassa semelhante entre eles. **Tabela 13:** Número de unidades formadoras de colônia por grama de solo com e sem tratamento de remediação e com e sem adição de *C. metallidurans* CH34 com diferentes tempos de incubação.

Tratamento	Tempo de incubação			
	zero	2 dias	4 dias	10 dias
ST SB* 1	$4,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^6$	$9,8 \times 10^6$	$1,6 \times 10^5$
ST SB 2	$3,8 \times 10^4$	$2,2 \times 10^6$	$8,5 \times 10^6$	$5,6 \times 10^4$
ST SB 3	$8,3 \times 10^4$	$3,1 \times 10^6$	$8,6 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$
ST CB 1	$4,4 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$	$1,4 \times 10^7$	$2,5 \times 10^4$
ST CB 2	$4,6 \times 10^8$	$1,1 \times 10^9$	$2,8 \times 10^6$	$4,0 \times 10^4$
ST CB 3	$3,0 \times 10^8$	$6,3 \times 10^9$	$2,1 \times 10^8$	$2,0 \times 10^4$
CT SB 1	$1,2 \times 10^5$	$1,0 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$	$2,7 \times 10^5$
CT SB 2	$1,4 \times 10^5$	$2,7 \times 10^7$	$5,6 \times 10^7$	$5,5 \times 10^5$
CT SB 3	$1,0 \times 10^5$	$1,2 \times 10^7$	$1,3 \times 10^8$	$3,5 \times 10^5$
CT CB 1	$3,3 \times 10^9$	$3,8 \times 10^8$	$1,2 \times 10^7$	$1,5 \times 10^4$
CT CB 2	$4,1 \times 10^9$	$5,3 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$	$1,3 \times 10^5$
CT CB 3	$4,2 \times 10^9$	$7,8 \times 10^8$	$2,0 \times 10^7$	$2,7 \times 10^4$

\*CT- solo com tratamento; ST- solo sem tratamento; CB- inoculado com *C. metallidurans*; SB- sem inoculação de *C. metallidurans*.

Foi ainda observado que o solo tratado apresentou uma carga microbiana inicial maior que o solo sem tratamento (Tabela 13). Essa maior biomassa no solo tratado provavelmente é devido à aplicação de calcário e compostos orgânicos. O efeito positivo destes materiais na microbiota pode ocorrer de duas maneiras: diminuindo a disponibilidade do Cobre no solo e/ou aumentando a disponibilidade de nutrientes nesse ambiente.

Com base nestes resultados foi decidido que o solo seria incubado com a bactéria por 48hs antes da extração das proteínas. Este período de incubação é importante para permitir que a bactéria entre em contato com o Cobre e possa expressar proteínas relacionadas a mecanismos de defesa contra este metal.

#### 4.2.1.3 Extração do proteoma do solo

A extração das proteínas do solo é uma etapa crítica nos estudos de proteômica e neste estudo foram testadas diferentes variações de protocolos até a obtenção de resultados satisfatórios.

Primeiramente foi testado um protocolo originalmente desenvolvido e utilizado em substrato estéril, composto de areia, argila e substâncias húmicas. No momento que esta metodologia foi utilizada em amostras de solos reais foram encontrados alguns problemas. Possivelmente a presença de substâncias húmicas e argilominerais no solo interferiu na extração das proteínas do solo, uma vez que as últimas podem ficar adsorvidas nestas moléculas (Nannipieri, 2006). Os processos de purificação utilizados ao mesmo tempo em que removem os argilominerais e substâncias húmicas das amostras podem remover juntos as proteínas adsorvidas nestas partículas. Quando foi realizada a separação das proteínas obtidas utilizando a técnica SDS-PAGE não foi possível observar a presença de bandas, indicando que não foi possível extrair essas moléculas das amostras de solo. Nesta etapa de testes de protocolo optou-se por utilizar SDS-PAGE para a separação das proteínas, uma vez que é uma técnica mais simples e rápida que a eletroforese de gel bidimensional (2-DE).

Após várias tentativas, com a utilização de diferentes extratores, foi possível a obtenção de uma quantidade de proteínas relativamente alta. Entretanto o material obtido ainda apresentava uma grande quantidade de impurezas, e novos procedimentos para limpeza das proteínas foram testados, como a utilização de fenol, ácidos e PVP. Por fim foi possível obter um protocolo capaz de extrair uma boa quantidade de proteínas (Tabela 14) com uma baixa quantidade de substâncias interferentes.

O método utilizado neste estudo para o rompimento das células microbianas e extração das proteínas das partículas de solo combinou o uso de detergentes químicos e métodos mecânicos. Para romper as células e solubilizar as proteínas primeiramente foi utilizada uma solução tampão fosfato salino (PBS) e dodecil sulfato de sódio (SDS). O SDS é um forte detergente que garante a lise das células e a solubilização das proteínas extraídas, além de ser compatível com a espectrometria de massa. Chourey et al. (2010) testaram dois diferentes protocolos para extração e concluíram que o método que utilizava SDS nesta etapa era mais eficiente que o que usava guanidina para a lise celular. A sonicação é um dos métodos mais comuns para quebrar as partículas de agregados de solo e também promover a lise das células e assim liberar as proteínas intracelulares (Ogunseitan, 2006). Esta etapa foi incluída para garantir a liberação das enzimas extracelulares que poderiam estar adsorvidas nas partículas de solo.

Outro ponto importante na extração do proteoma do solo é a purificação das proteínas. Após as etapas de extração a suspensão obtida foi centrifugada e as proteínas ficaram solubilizadas no sobrenadante. O líquido obtido nesta etapa apresentava uma cor escura indicando que junto com as proteínas também foram extraídas substâncias húmicas do solo. Na primeira tentativa de purificar este extrato foi utilizada uma coluna de polivinilpirrolidona (PVP) acidificada para a remoção de fenóis e das substâncias húmicas, que ficam adsorvidos neste polímero (Masciandaro et al. 2008). O uso desta técnica apresentou bons resultados, sendo que após duas passagens pela coluna a amostra já apresentava uma coloração mais clara e límpida. Mas após a



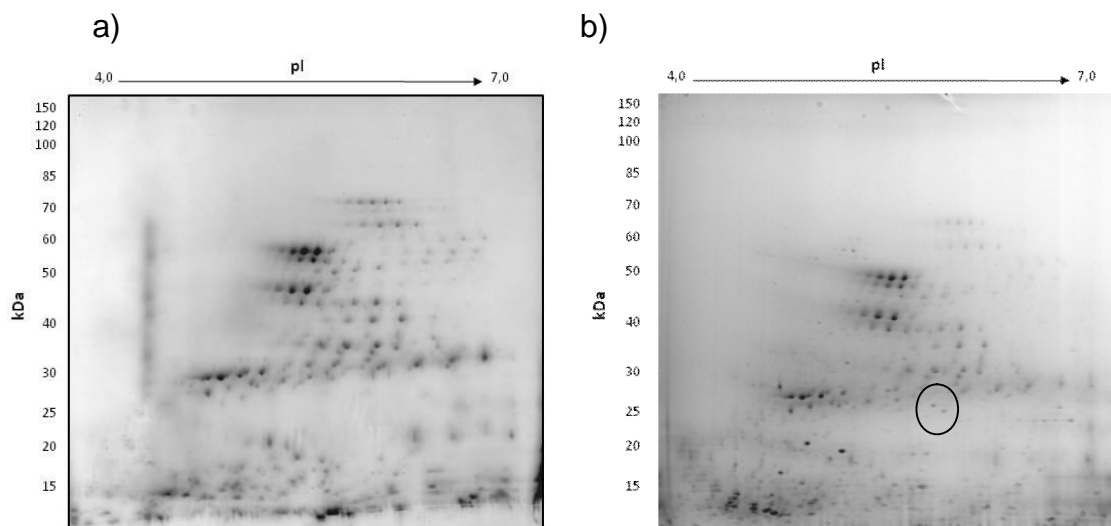
precipitação das proteínas e posterior separação por SDS-PAGE foi constatado ainda havia uma grande quantidade de substâncias interferentes.

Finalmente foi adicionada mais uma etapa de purificação com a utilização de ácido tricloroacético (TCA). Este reagente é eficiente na eliminação de fenóis e polissacarídeos (Görg et al., 2004) e diversos pesquisadores têm optado pela sua utilização em etapas de purificação de proteínas. A utilização de acetona, clorofórmio e metanol para precipitação das proteínas é uma técnica já consagrada e amplamente utilizada em estudos de proteômica, seja de culturas puras ou de amostras ambientais. As funções destes solventes orgânicos é eliminar qualquer substância que possa interferir na posterior separação das proteínas, como lipídeos, sais e o próprio SDS utilizado na extração.

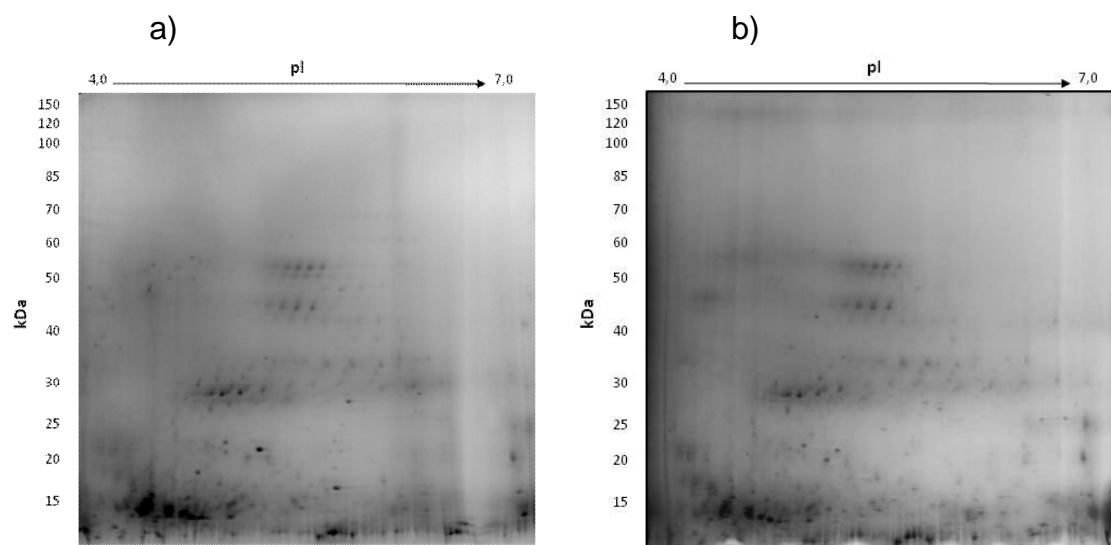
As quantidades de proteínas totais extraídas dos solos tratados e não tratado foram semelhantes, em torno de  $250\mu\text{g g}^{-1}$  solo. Estes valores são maiores do que os obtidos por Taylor & Willians (2010) que trabalharam com solos com e sem adição tolueno, utilizando *Stenotrophomonas maltophilia* como microrganismo indicador. Estes autores extraíram do solo sem tolueno  $177\mu\text{g}$  de proteínas  $\text{g}^{-1}$  solo e do solo com tolueno  $117\mu\text{g}$  de proteínas  $\text{g}^{-1}$  solo.

#### 4.2.1.4 Separação das proteínas

O método escolhido para separação das proteínas foi a eletroforese de gel bidimensional devido ao grande poder de separação deste método. Imagens dos géis 2-DE com as proteínas extraídas de *C.metalludurans* CH34 em presença e ausência de Cobre e dos solos inoculados com a cultura estão apresentadas nas Figuras 12 e 13. Foram realizadas comparações entre o proteoma da bactéria pura e o da bactéria exposta ao Cobre. Foi também comparado o proteoma dos solos tratado e não tratado com o proteoma da cultura exposta ao metal.



**Figura 12:** Géis bidimensionais de proteínas extraídas de *C.metalludurans* CH34 (a) e *C.metalludurans* CH34 + Cu (b).



**Figura 13:** Géis bidimensionais de proteínas extraídas de solo sem tratamento + *C.metalludurans* CH34 (a) e solo com tratamento + *C.metalludurans* CH34 (b).

O proteoma da bactéria *C.metalludurans* CH34 exposta ao Cobre apresentou várias diferenças em relação ao proteoma da cultura pura (Figura 12). Essas diferenças foram tanto qualitativas (ausência/presença de pontos protéicos) como quantitativas (intensidade dos pontos protéicos). Quanto maior a intensidade do ponto protéico maior a concentração da proteína. Alguns dos *spots* que foram observados somente na cultura exposta ao Cobre estão localizados na zona do gel onde Noël-Georis et al. (2004) identificaram proteínas relacionadas a mecanismos de defesa a esse elemento.

O cobre no solo é principalmente associado com a matéria orgânica formando complexos estáveis ou solúveis. As diferenças observadas no padrão das proteínas entre os solos tratado e não tratado possivelmente refletem o efeito da remediação na complexação e solubilidade do Cobre, diminuindo assim o seu efeito sobre o organismo indicador. Estas diferenças, assim como o que ocorreu no proteoma da cultura pura, foram tanto qualitativas quanto quantitativas. A maior quantidade de Cobre disponível no solo não tratado (1100mg Cu Kg<sup>-1</sup> de solo) em relação ao tratado (260mg Cu Kg<sup>-1</sup> de solo) pode interferir nas comunidades deste ambiente inibindo algumas espécies microbianas e favorecendo outras que possuem mecanismos de resistência ao Cobre. A maior quantidade deste metal também pode induzir mudanças no metabolismo microbiano alterando e até induzindo a expressão de diversas proteínas que não estejam relacionadas diretamente às estratégias de resistência ao Cobre. Essas hipóteses poderão ser confirmadas após a identificação das proteínas que diferiram entre os tratamentos.

Todos os pontos protéicos que apresentaram alguma diferença entre os tratamentos, seja qualitativa ou quantitativa, foram avaliados estatisticamente e aqueles que apresentaram diferença significativa foram enviados para identificação por espectrometria de massa.

#### 4.2.2 Proteoma da Solução do Solo

Este estudo foi realizado para testar o protocolo originalmente desenvolvido para extração do proteoma do solo em amostras de solução do solo. Uma das vantagens deste tipo de abordagem é que neste ambiente os teores de substâncias húmicas e argilominerais são consideravelmente menores do que no solo, facilitando assim a extração e purificação das proteínas. Mas antes da extração do proteoma foi realizada uma avaliação simples da biomassa microbiana presente nas amostras de solução do solo para quantificá-la e caracterizá-la quanto à resistência ao cobre.

Com relação à quantidade de microrganismos cultiváveis praticamente todos os tratamentos apresentaram uma contagem em torno de 10<sup>4</sup> células por ml de solução (Tabela 14), apenas na solução do solo sem

tratamento e com plantas (ST) foi verificada uma menor quantidade de células por ml de solução. Neste tratamento também foi verificada uma maior proporção de microrganismos resistentes ao Cobre em relação aos outros tratamentos. Este resultado indica que o Cobre além de diminuir a população microbiana total desse tratamento, exerceu uma pressão de seleção.

As amostras que apresentaram uma menor taxa de microrganismos resistentes foram as das soluções dos solos com adição de resíduos orgânicos e corretivos de acidez (CO, CD e CDCO), indicando que estes tratamentos ao diminuir a disponibilidade de cobre no solo e conseqüentemente na solução do solo diminuem a pressão de seleção desse metal na microbiota do solo.

**Tabela 14:** Número de unidades formadoras de colônia em 1ml de solução coletada de solos contaminados com Cobre com e sem tratamento de remediação.

<b>Tratamento</b>	<b>Meio mínimo</b>	<b>Meio mínimo + Cu 0,8mM*</b>	<b>% resistentes</b>
<b>ST**</b>	2,3 X 10 <sup>3</sup>	8,2 X 10 <sup>2</sup>	35
<b>STSP</b>	2,1 X 10 <sup>4</sup>	4,1 X 10 <sup>3</sup>	19
<b>CO</b>	1,2 X 10 <sup>4</sup>	4,1 X 10 <sup>2</sup>	3,4
<b>CD</b>	2,5 X 10 <sup>4</sup>	4,6 X 10 <sup>2</sup>	1,8
<b>CDCO</b>	4,1 X 10 <sup>4</sup>	1,4 X 10 <sup>3</sup>	3,4

\*média de 3 repetições

\*\*ST . sem tratamento; STSP . sem tratamento e sem plantas; CO . composto orgânico; CD . calcário dolomítico; CDCO . composto orgânico e calcário dolomítico.

O protocolo de extração originalmente desenvolvido para solos apresentou uma boa eficiência também para as amostras de solução do solo, com uma boa quantidade de proteínas extraídas (Tabela 15). A maior quantidade de proteínas foi obtida no tratamento com adição de calcário, e a menor quantidade foi extraída da solução do solo sem tratamento.

**Tabela 15:** Concentração de proteínas ( $\mu\text{g}$ ) em 100 ml de solução coletada de solos contaminados com Cobre com e sem tratamento de remediação.

<b>Tratamento</b>	<b>Concentração (<math>\mu\text{g}\cdot 100\text{ml}^{-1}</math>)*</b>
ST**	595,5 c***
STSP	729,0 b
CO	819,0 b
CD	1047,0 a
CDCO	749,0 b

\*média de 3 repetições

\*\*ST . sem tratamento; STSP . sem tratamento e sem plantas; CO . composto orgânico; CD . calcário dolomítico; CDCO . composto orgânico e calcário dolomítico.

\*\*\* médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste t de Tukey a 5%.

Outra diferença observada entre os tratamentos se refere ao número de pontos protéicos detectados (Tabela 16). Os tratamentos CD e CO apresentaram o maior número de spots, indicando uma maior diversidade de proteínas em relação aos solos não tratados. Novamente o solo sem tratamento e com plantas apresentou os piores resultados, com o menor número de pontos protéicos.

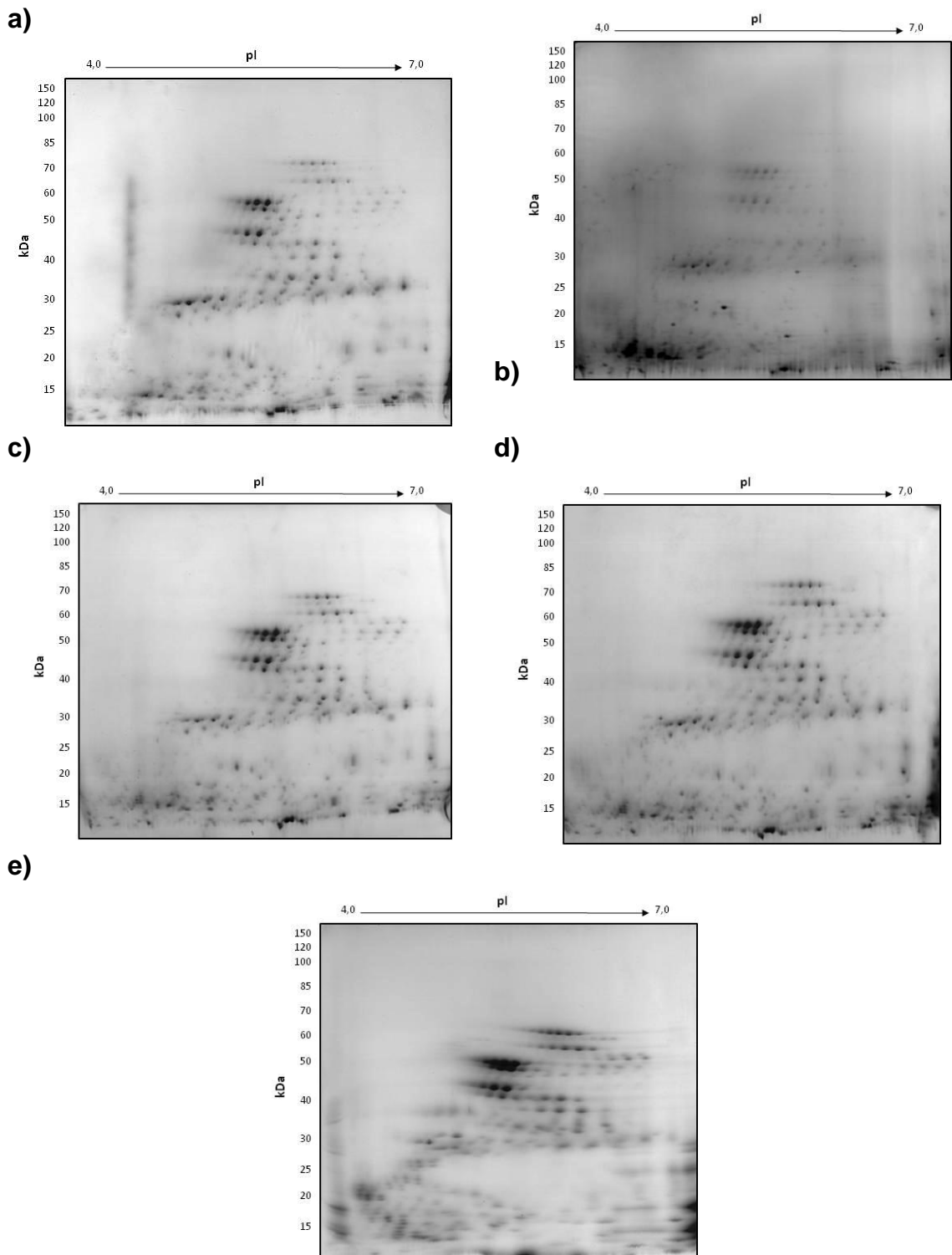
**Tabela 16:** Quantidade de pontos protéicos observados em géis bidimensionais obtidos de amostras de solução de solos sob diferentes condições.

<b>Tratamento</b>	<b>Nº pontos protéicos*</b>
<b>ST**</b>	286
<b>STSP</b>	331
<b>CO</b>	383
<b>CD</b>	402
<b>CDCO</b>	299

\*média de 3 repetições

\*\*ST . sem tratamento; STSP . sem tratamento e sem plantas; CO . composto orgânico; CD . calcário dolomítico; CDCO . composto orgânico e calcário dolomítico.

Os géis obtidos após a separação das proteínas das amostras de solução do solo mostram diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 14).



**Figura 14:** Géis bidimensionais de proteínas extraídas da solução do solo sem tratamento e sem plantas (a), sem tratamento e com plantas (b), com adição de calcário (c), com adição de composto orgânico (d) e com adição de composto orgânico e calcário (e).

Diferenças estatísticas foram observadas em 20 pontos protéicos entre os cinco tratamentos (Tabela 17). A maioria das diferenças está relacionada com a intensidade dos spots, sendo que quanto mais intenso maior a quantidade da proteína. Todos os pontos protéicos que apresentaram diferença estatística foram enviados para identificação por espectrometria de massa.

A redução das formas lábeis de cobre no solo pode reduzir o efeito negativo deste metal na microflora deste ambiente (Renella et al., 2003; Chaperon & Sauvé, 2007). No caso do presente estudo os teores de cobre solúvel são menores nos solos tratados (Tabela 02), favorecendo a microbiota e aumentando a quantidade de proteínas expressas. Estes resultados estão de acordo com Singleton et al. (2003) que demonstraram que a presença de Cadmio em solos afetou tanto a concentração total como a distribuição no tamanhos das proteínas destes solos. Nesse sentido Sandaa et al. (2001) propôs a utilização da concentração de proteínas do solo como um indicador sensível da resposta da biomassa microbiana ao estresse da contaminação por metais pesados.

Após a espectrometria de massa foram identificadas poucas proteínas, assim como os organismos que as sintetizam. Mas o padrão das proteínas foi significativamente diferente entre os vários tratamentos. No entanto bancos de dados de proteínas incompletos não permitiram identificar a função e origem das proteínas, e por isso não foi possível comprovar até o momento o potencial da proteômica para avaliar o efeito dos tratamentos de remediação. Esse tipo de problema na identificação é bastante comum em amostras ambientais, especialmente no solo, uma vez que muitas das espécies presentes nesses ambientes ainda não são conhecidas, e muitas proteínas sintetizadas por estas espécies ainda não foram identificadas e descritas.

**Tabela 17-** Porcentagem de volume dos pontos protéicos que apresentaram diferença estatística em amostras de solução de solo contaminado com Cobre sob diferentes tratamentos de remediação.

N° Ponto Protéico	TRATAMENTOS				
	STSP*	ST	CO	CD	COCD
SS 19	0,410 a**	0 b	0 b	0,256 ab	0 b
SS 22	0,337 a	0 b	0,058 ab	0,175 ab	0 b
SS 82	0,351 a	0 b	0,089 ab	0,252 ab	0,169 ab
SS 83	0,166 a	0 b	0,131 ab	0,130 ab	0,017 b
SS 120	0,048 b	0,178 ab	0,352 a	0,147 ab	0,297 ab
SS 123	0,037 b	0,162 ab	0,221 ab	0,081 ab	0,318 a
SS 127	0,144 b	0,453 ab	0,648 a	0,374 ab	0,608 a
SS 128	0,095 b	0,280 ab	0,372 a	0,266 ab	0,290 ab
SS 132	0,081 b	0 b	0,578 a	0,242 b	0,571 a
SS 133	0,167 b	0,651 ab	1,086 ab	0,503 ab	1,108 a
SS 136	0,178 b	0,387 ab	0,734 a	0,412 ab	0,758 a
SS 205	0,205 ab	0 b	0,528 a	0,183 ab	0,028 ab
SS 206	0,076 bc	0,207 a	0,019 cb	0,094 b	0 c
SS 209	0,698 a	0 b	0,365 ab	0,458 ab	0,089 b
SS 211	0,138 a	0 b	0,030 b	0 b	0 b
SS 226	0,381 a	0 b	0,213 ab	0,215 ab	0 b
SS 236	0,130 ab	0 b	0,382 a	0 b	0 b
SS 247	0,046 b	0 b	0,061 b	0,281 a	0 b
SS 301	1,554 a	0 b	0,370 bc	1,146 ab	0,270 c
SS 302	1,076 a	0 b	0,163 b	0,599 ab	0,214 b

\* ST . sem tratamento; STSP . sem tratamento e sem plantas; CO . composto orgânico; CD . calcário dolomítico; CDCO . composto orgânico e calcário dolomítico.

\*\* Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.



Visando aperfeiçoar o processo de identificação das proteínas foram adotadas duas abordagens. Na primeira optou-se por seqüenciar geneticamente as amostras para identificar as espécies microbianas presentes nas amostras e com isso utilizar banco de dados mais específicos para identificação das proteínas. Mas novamente poucas proteínas foram identificadas. Na segunda abordagem, ainda em andamento, está sendo utilizada a técnica de seqüenciamento *de novo*. Esta técnica é utilizada na elucidação da seqüência de peptídeos de um aminoácido utilizando os dados de MS/MS sem o auxílio de um banco de dados. Lacerda et al. (2007) utilizaram esta técnica com sucesso trabalhando com o proteoma de uma comunidade bacteriana exposta ao Cadmio. Estes autores conseguiram obter após a espectrometria 189 seqüências e identificaram apenas 50 proteínas quando utilizaram a comparação com banco de dados. Mas quando realizaram o seqüenciamento *de novo* identificaram mais 158 proteínas, assim como as suas funções.

Com base nos resultados obtidos até o momento é possível visualizar o potencial de uso da proteômica em amostras de solução do solo para avaliar os efeitos da remediação em áreas contaminadas com cobre. No entanto para que este indicador seja efetivamente utilizado em estudos de monitoramento é necessário um estudo de validação correlacionando a concentração do metal com a quantidade e expressão de proteínas.



## 5.CONCLUSÕES

- A biomassa, respiração basal e hidrólise do diacetato de fluoresceína foram sensíveis para detectar alterações nos solos sob diferentes usos.
- A atividade da desidrogenase e N mineralizado não apresentaram um desempenho uniforme, sendo que em algumas áreas não apresentaram diferenças significativas entre os solos avaliados.
- A diversidade funcional avaliada com microplacas BIOLOG-Eco não diferiu significativamente entre as áreas.
- Quando estes parâmetros foram considerados em conjunto na forma de um único índice numérico foi possível diferenciar os usos e manejos dos solos.
- O novo protocolo desenvolvido para extração do proteoma do solo também é eficiente em amostras de solução do solo.
- A análise da proteômica da solução do solo foi sensível para avaliar os efeitos da remediação em solos contaminados com cobre.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, G.; DUNCAN, H. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 943-951, 2001.
- ALEF, K. Estimation of microbial activities. In: ALEF, K. & NANNIPIERI, P. (Ed.) **Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry**. New York: Academic Press, 1998. p.193-262.
- ANDERSON, J. P. E.; DOMSCH, K. H. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.10, p. 215-221, 1978.
- ANDERSON, J. P. E. Soil respiration. In: PAGE, A. L.; MILLER, R. H.; KEENEY, D. R. (Ed.). **Method of analysis**. 2nd ed. part 2. Madison: American Society of Agronomy: Soil Science Society of America, 1982. p. 831-871.
- ANDRADE, S. A. L.; SILVEIRA, A. P. D. Biomassa e atividade microbiana do solo sob influência de chumbo e da rizosfera da soja micorrizada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 2, p. 1191-1198, 2004.
- ANDRÉA, M. M.; MORENO HOLLWEG, J. L. Comparação de métodos para determinação de biomassa microbiana em dois solos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 28, n. 6, p. 981-986. 2004.
- ANDREWS, S. S. et al. On-farm assessment of soil quality in California's Central Valley. **Agronomy Journal**, Madison, v. 94, p. 12-23, Jan. 2002.
- BANDICK, A.K.; DICK, R.P. Field management effects on soil enzyme activities. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.31, n. 11, p.1471-1479, 1999.
- BENDING, G. D.; PUTLAND, C.; RAYNS, F. Changes in microbial community metabolism and labile organic matter fractions as early indicators of the impact of management on soil biological quality. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 31, p78-84, 2000.

BENNDORF, D. et al. Functional metaproteoma analysis of protein extracts from contaminated soil and groundwater. **The ISME Journal**, Wallingford, v. 1, p. 224-234, May 2007.

BENINTENDE, S. M. et al. Soil microbiological indicators of soil quality in four rice rotations systems. **Ecological Indicators**, Amsterdam: Elsevier, v. 8, n. 5, p. 704-708, Sep. 2008.

BLOEM, J. et al. Monitoring and evaluating soil quality. In: BLOEM, J.; HOPKINS, D. W.; BENEDETTI, A. (Ed.) **Microbiological methods for assessing soil quality**. Oxfordshire: CABI Publishing, 2006. p. 23-49.

BRANDFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Amsterdam: Elsevier, v. 72, p. 248-254, May 1976.

BREURE, A. M. et al. Ecological classification and assessment concepts in soil protection. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Amsterdam: Elsevier, v. 62, n. 2, p. 211-229, Oct. 2005.

BUNDY, L. G.; MEISINGER, J. J. Nitrogen availability indices. In: WEAVER, R. W. et al. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Part 2: Microbiological and biochemical properties, n. 5. Soil Science Society of America, 1994. p. 951-984.

BURNS, R. G. et al. Defining Soil Quality. In: BLOEM, J.; HOPKINS, D. W.; BENEDETTI, A. (Ed.) **Microbiological methods for assessing soil quality**. Oxfordshire: CABI Publishing, 2006. p. 15-22.

CANALI, S.; BENEDETTI, A. Soil Nitrogen Mineralization. In: BLOEM, J.; HOPKINS, D. W.; BENEDETTI, A. (Ed.). **Microbiological methods for assessing soil quality**. Oxfordshire: CABI Publishing, 2006. p 127-150.

CASALINHO, H. D. **Qualidade do solo como indicador de sustentabilidade de agroecossistemas**. 2003. 187 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2003.

CHOUREY, K. et al. Direct Cellular Lysis Protein Extraction Protocol for Soil Metaproteomics. **Journal of Proteome Research**. Washington, v. 9, p. 6615-6622, Nov. 2010.

COSTA, E. A.; GOEDERT, W. J.; SOUSA, D. M G. Qualidade de solo submetido a sistemas de cultivo com prepare convencional e plantio direto. **Pesquisa agropecuária brasileira**. Brasília, v. 41, n. 7, p. 1185-1191. 2006.

DE-POLLI, H.; GUERRA, J. G. M. C, N e P na biomassa microbiana do solo. In: SANTOS, G. de A.; CAMARGO, F. A. de O. (Ed.) **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais**. Porto Alegre: Gênese. 1999, p. 389-412.

DERRY, A. M.; STADDON, W. J.; TREVORS, J. T. Functional diversity and community structure of microorganisms in uncontaminated and creosote-contaminated soils as determined by sole-carbon-source-utilization. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. Springer, v. 14, n. 4, p. 571-578, 1998.

DICK, R. P. Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health. In: PANKHURST, C.; DOUBE, B.; GUPTA, V. (Ed.) **Biological Indicators of Soil Health**. Wallingford: CAB International, 1997. p. 121-156.

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: Soil Science Society of America Special Publication, n. 35, 1994. p. 3-21.

ENSSLIN, L.; MONTIBELLER NETO, G.; NORONHA, S. M. **Apoio à decisão: metodologias para estruturação de problemas e avaliação multicritério de alternativas**. Florianópolis: Insular, 2001. 296 p.

FREY, B. et al. Microbial activity and community structure of a soil after heavy metal contamination in a model forest ecosystem. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 38, n. 7, p. 1745-1756, July 2006.

GAMA-RODRIGUES, E.F.; BARROS, N.F. Ciclagem de nutrientes em floresta natural e plantios de eucalipto e de dandá no sudeste da Bahia, Brasil. **Revista Árvore**, Viçosa, v.26, n. 2, p.193-207, 2002.

GIANFREDA, L. et al. Soil enzyme activities as affected by anthropogenic alterations: intensive agricultural practices and organic pollution. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 341, n. 1-3, p. 265-279, 2005.

GOMEZ, E.; GARLAND, J.; CONTI, M. Reproducibility in the response of soil bacterial community-level physiological profiles from a land use intensification gradient. **Applied Soil Ecology**, Kidlington, v. 26, n.1, p. 21-30, 2004.

GONG, P. et al. Effects and bioavailability of 2, 4, 6 - trinitrotoluene in spiked and field-contaminated soils to indigenous microorganisms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Malden, v. 18, n. 12, p. 2681-2688, 1999.

GREEN, V. S.; STOTT, D. E.; MIACK, M. Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 38, n. 3, p. 693-701, 2006.

HERRICK, J. E. Soil quality: an indicator of sustainable land management? **Applied Soil Ecology**, Amsterdam: Elsevier, v. 15, n. 1, p. 75 . 83, 2000.

HOPER, H. Substrate-induced Respiration. In: BLOEM, J.; HOPKINS, D. W.; BENEDETTI, A. (Ed.) **Microbiological Methods for Assessing Soil Quality**. Oxfordshire: CABI Publishing, 2006. p. 84-92.

INSAN, H. A new set of substrates proposed for community characterization in environmental samples. In: Insan, H.; Rangger, A. (Ed.). **Microbial communities: functional versus structural approaches**. Berlin: Springer, 1997. p. 259-260.

JENKINSON, D. S.; LADD, J. N. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. In: PAUL, E. A.; LADD, J. N. (Ed.). **Soil Biochemistry**. New York: Marcel Dekker, v. 5, 1981. p. 415-471.

JENKINSON, D. S.; POWLSON, D. S.; WEDDERBURN, R. W. M. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil . III. The relationships between soil biovolume measured by optical microscopy and the flush of decomposition caused by fumigation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 189-202, 1976.

KENNEDY, A. C.; PAPENDICK, R. I. Microbial characteristics of soil quality. **Journal of Soil and Water Conservation**, Ankeny, v. 50, n. 3, p. 243-248, 1995.

KNIGHT, B. P.; MCGRATH, S. P.; CHAUDRI, A. M. Biomass carbon measurements and substrate utilization patterns of microbial populations from soils amended with cadmium, copper, or zinc. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n.1, p. 39-43, 1997.

KONOPKA, A.; OLIVER, L.; TURCO Jr., R. F. The Use of Carbon Substrate Utilization Patterns in Environmental and Ecological Microbiology. **Microbial Ecology**, Berlin: Springer, v. 35, n. 2, p. 103-115, 1998.

KUNPIENE, J. et al. Microbial biomass, respiration and enzyme activities after in situ aided phytostabilization of a Pb- and Cu-contaminated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam: Elsevier, v. 72, n. 1, p. 115-119, 2009.

LACERDA, C. M. R.; CHOE, L. H.; REARDON, K. F. Metaproteomic Analysis of a Bacterial Community Response to Cadmium Exposure. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 6, n. 3, p. 1145-1152, 2007.

LAL, R. **Methods and guidelines for assessing sustainable use of soil and water resources in the tropics**. SMSS Technical Monograph, n. 21. Columbus: Department of Agronomy, 1994. 74 p.

LI, Z.; WU, X.; CHEN, B. Changes in transformation of soil organic C and functional diversity of soil microbial community under different land uses. **Agricultural Sciences in China**, Amsterdam: Elsevier, v. 6, n. 10, p. 1235-1245, October 2007.

LIN, Q; BROOKES, P. C. Comparison of methods to measure microbial biomass in unamended, ryegrass-amended and fumigated soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 28, n. 7, p. 933-939. 1996.



LISBOA, B. B. **Parâmetros microbiológicos como indicadores de qualidade do solo em sistemas de manejo**. 2009. 89f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) . Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

LORCH, H. J.; BENCKIESER, G.; OTTOW, J. C. G. Basic methods for counting microorganisms in soil and water. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (Ed.). **Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry**. New York: Academic Press, 1995. p. 146-161.

MaCDONALD, R. M. Extraction of microorganisms from soil. **Biological Agriculture and Horticulture: an international journal**, Oxon, v. 3, n. 4, p. 361-365, 1986.

MARON, P. A. et al. Protein and DNA fingerprinting of a soil bacterial community inoculated into three different sterile soils. **Research in Microbiology**, Amsterdam: Elsevier, v. 159, n. 4, p. 231-236, may 2008.

MARON, P. A. et al. Protein extraction and fingerprinting optimization of bacterial communities in natural environment. **Microbial Ecology**. Berlin: Springer, v. 53, n. 3, p. 426-434, april 2007a.

MARON, P. A et al. Metaproteomics: a new approach for studying functional microbial ecology. **Microbial Ecology**. Berlin: Springer, v. 53, n. 3, p. 486-493, april 2007b.

MASCIANDARO, G. et al. Comparison of extraction methods for recovery of extracellular  $\alpha$ -glucosidase in two different forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 2156-2161, 2008.

MASERA, O.; ASTIER, M.; RIDAURA, S. L. **Sustentabilidad y manejo de recursos naturales**. El marco de evaluación MESMIS. México: Mundi Prensa, 1999. 110 p.

MASTO, R. E. et al. Changes in soil biological and biochemical characteristics in a long field trial on a sub-tropical inceptisol. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 38, n. 7, p 1577-1582, 2006.

MATSUOKA, M; MENDES, I. C.; LOUREIRO, M. F.; Biomassa microbiana e atividade enzimática em solos sob vegetação nativa e sistemas agrícolas anuais e perenes na região de Primavera do Leste (MT). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, n. 3, p. 425-433. 2003.

MATSUOKA, M. **Atributos biológicos de solos cultivados com videira na região da Serra Gaúcha**. 2006. 171 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

MERGEAY, M. et al. *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. **Journal of**

**Bacteriology**, American Society for Microbiology, v.162, n. 1, p. 328-34, April 1985.

MIJANGOS, I. et al. Effects of fertilization and tillage on soil biological parameters. **Enzyme and Microbial Technology**. Amsterdam: Elsevier, v. 40, n. 1, p. 100-106, 2006.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. ed. atual. e ampl. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

MORENO, J. et al. The ecological dose value (ED50) for assessing Cd toxicity on ATP content and dehydrogenase and urease activities of soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 33, n. 4-5 p. 483-489, April 2001.

MUNGAI, N. W. et al. Spatial variation of soil enzyme activities and microbial functional diversity in temperature alley cropping systems. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 42, n. 2, p.129-136, 2005.

NANNIPIERI, P. Role of Stabilised Enzymes in Microbial Ecology and Enzyme Extraction from Soil with Potential Applications in Soil Proteomics. In: NANNIPIERI, P.; SMALLA, K. (Org.). **Nucleic Acids and Proteins in Soil**. Berlin: Springer, 2006. p.75-90.

NOËL-GEORIS, I. et al. Global analysis of the *Ralstonia metallidurans* proteome: prelude for the large-scale study of heavy metal response. **Proteomics**, Weinheim, v.4, n.1, p.151-179, Jan 2004.

O'CONNELL, S. et al. Basic program for reduction of data from community-level physiological profiling using Biolog microplates: rational and critical interpretation of data. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam: Elsevier, v.40, p.213-220, 2000.

OGUNSEITAN, O. A. Soil Proteomics: extraction and analysis of proteins from soils. In: NANNIPIERI, P.; SMALLA, K. (Org.). **Nucleic Acids and Proteins in Soil**. Berlin: Springer, 2006. p. 95-112.

PERUCCI, P. et al. Effects of organic amendment and herbicide treatment on soil microbial biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 32, n.1, p. 17-23, 2000.

RIFFALDI, R. et al. Soil biological activities in monitoring the bioremediation of diesel oil-contaminated soil. **Water, Air and Soil Pollution**, Totowa: Springer, v. 170, n. 3-15, p.3-15, 2006.

ROCHA, T. L. et al. **Comunicado Técnico 136**: Eletroforese Bidimensional e análise de proteomas. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF, outubro 2005.

ROS, M. et al. 16S rDNA analysis reveals low microbial diversity in community level physiological profile assays. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam: Elsevier, v. 72, n. 3, p. 221-226, March 2008.

SCHLOTTER, M.; MUNCH, J. C.; LYNCH, J. M. Managing soil quality. In: BLOEM, J.; HOPKINS, D. W.; BENEDETTI, A. (Eds.) **Microbiological methods for assessing soil quality**. Oxfordshire: CABI Publishing, 2006. p. 50-62.

SCHMITZ, J. A. K. **Indicadores biológicos de qualidade do solo**. 2003. 234 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

SCHULZE, W. X. et al. A proteomic fingerprint of dissolved organic carbon and soil particles. **Oecologia**, Heidelberg, v. 142, n. 3, p. 335-343, 2005.

SHARMA, S. et. al. Functional diversity of soil bacterial communities increases after maize litter amendment. **European Journal of Soil Biology**, Amsterdam: Elsevier, v. 34, n.2, p. 53-60, april-june 1998.

SINGLETON, I. et al. The potential of soil protein-based methods to indicate metal contamination. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam: Elsevier, v. 23, n. 1, p. 25-32, May 2003.

SMITH, J. L.; PAUL, E. A. The significance of soil microbial biomass estimations. In: BOLLAG, J. M.; STOTZKY, G. (Ed.) **Soil Biochemistry**. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 339-357.

STARK, C. H et. al. Differences in soil enzyme activities, microbial community structure and short-term nitrogen mineralization resulting from farm management history and organic matter amendments. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 1352-1363, 2008.

STEVENSON, F. J. The Internal Cycle of Nitrogen in Soil. **Cycle of Soil: carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients**. New York: Wiley & Sons, 1986. p. 155-215.

STOTZKY, G. Activity, Ecology and Population dynamics of soil microorganisms. **Critical Reviews in Microbiology**, New York, p. 59-137, Nov. 1972.

SWISHER, R.; CARROLL, G. C. Fluorescein diacetate hydrolysis as an estimator of microbial biomass on coniferous needle surfaces. **Microbial Ecology**, Heidelberg, v. 6, p. 217-226, 1980.

TAYLOR, E. B; WILLIAMS, M. A. Microbial Protein in Soil: Influence of Extraction Method and C Amendment on Extraction and Recovery. **Microbial Ecology**, Heidelberg, v. 59, n. 2, p. 390-399, 2010.

TEDESCO, M. J. et al. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre: Departamento de Solos da UFRGS, 174 p.,1995. (Boletim Técnico de Solos, 5).

TISCHER, S.; TANNEBERG, H.; GUGGENBERGER, G. Microbial parameters os soils contaminated with heavy metals: assessment for ecotoxicological monitoring. **Polish Journal of Ecology**, v. 56, n. 3, p. 471-479, 2008.

TOBOR-KAPLON, M. A. et al. Functional stability of microbial communities in contaminated soils. **Oikos**, Lund, v. 111, n. 1, p.119-129, 2005.

UNITED NATIONS CONFERENCE ON ENVIRONMENT AND DEVELOPMENT (UNCED). Agenda 21: the Rio Declaration on Environment and Development, the Statement of Forest Principles, the United Nations Framework Convention on Climate Change and the United Nations Convention on Biological Diversity. Rio de Janeiro, June 1992.

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

WELP, G. Inhibitory effects of the total and water-soluble concentrations of nine different metals on the dehydrogenase activity of a loess soil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 30, n.1-2, p. 132-139, 1999.

YAN, F.; McBRATNEY, A. B.; COPELAND, L. Functional substrate biodiversity of cultivated and uncultivated A horizons of vertisols in NW New South Wales. **Geoderma**, Amsterdam: Elsevier, v. 6, n. 4, p. 321-343, 2000.

YAO, H. et al. Microbial biomass and community structure in a sequence of soils with increasing fertility and changing land use. **Microbial Ecology**, Berlin: Springer, v.40, n. 3, p. 223-237, 2000.

ZHANG, P. et al. Soil quality changes in land degradation as indicated by soil chemical, biochemical and microbiological properties in a karst area of southwest Guizhou, China. **Environmental Geology**, Berlin: Springer, v. 51, n. 4, p. 609. 619, 2006.

## APÊNDICES

**Apêndice 01** . Umidade gravimétrica (%) de amostras em solo sob diferentes usos coletadas nos municípios de Tio Hugo (RS), Eldorado do Sul (RS) e Londrina (PR) em duas épocas de amostragem.

Local	1ª amostragem (janeiro/2009)	2ª amostragem (julho/2009)
<b>Tio Hugo</b>		
Mata	27%	35%
Plantio Direto	23%	28%
<b>Eldorado do Sul</b>		
Campo	22%	36%
Eucalipto	16%	13%
<b>Londrina</b>		
Mata	29%	43%
Cana de açúcar	21%	30%
Plantio Direto	---	35%
Plantio Convencional	---	31%

**Apêndice 02:** Resultados relativos (%) dos atributos biológicos de Latossolo Vermelho distrófico sob mata nativa e plantio direto soja/trigo, na camada de 0-10cm, no município de Tio Hugo (RS), em amostras coletadas em janeiro de 2009 (1ª amostragem) e julho de 2009 (2ª amostragem).

Parâmetro	Valores relativos (%)			
	1º amostragem		2º amostragem	
	Mata	PD	Mata	PD
Biomassa Microbiana	100	47	100	36
Respiração Basal	100	52	100	36
N mineralizado	100	44	100	47
Hidrólise DAF	100	99	100	82
Desidrogenase	100	57	100	40
Índice de Shanonn	100	98	100	88

**Apêndice 03:** Resultados relativos (%) dos atributos biológicos de Argissolo sob campo nativo e eucalipto, na camada de 0-10cm, no município de Eldorado do Sul (RS), em amostras coletadas em janeiro de 2009 (1ª amostragem) e julho de 2009 (2ª amostragem).

Parâmetro	Valores relativos (%)			
	1º amostragem		2º amostragem	
	Campo	Eucalipto	Campo	Eucalipto
Biomassa Microbiana	100	44	100	20
Respiração Basal	100	52	100	35
N mineralizado	100	90	100	41
Hidrólise DAF	100	85	100	49
Desidrogenase	100	48	100	25
Índice de Shanonn	100	80	100	81

**Apêndice 04:** Resultados relativos (%) dos atributos biológicos de Latossolo Vermelho distroférico sob mata nativa e cana de açúcar, na camada de 0-10cm, no município de Londrina (PR), em amostras de solo coletadas em janeiro de 2009 (1ª amostragem) e julho de 2009 (2ª amostragem).

Parâmetro	Londrina					
	1º amostragem		2º amostragem			
	Mata	Cana	Mata	Cana	PD	PC
Avaliação Biomassa Microbiana	100	21	100	13	26	8
Respiração Basal	100	21	100	13	22	18
N mineralizado	100	12	100	11	20	3
Hidrólise DAF	100	27	100	73	134	92
Desidrogenase	100	22	100	10	26	16
Índice de Shanonn	100	84	100	95	92	95