

Hidrólise de diacetato de fluoresceína como bioindicador da atividade microbiológica de um solo submetido a reflorestamento

Fluorescein diacetate hydrolysis as a bioindicator of microbial activity in soil under reforestation

Michelle Silva¹ Edmar Ramos Siqueira² Jefferson Luis da Silva Costa³

RESUMO

A atividade microbiológica tem sido utilizada como bioindicador da qualidade de solos. Neste trabalho, testou-se o método de hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) para determinar a atividade microbiológica de um solo submetido a quatro tratamentos: reflorestamento com espécies nativas da mata atlântica, reflorestamento com espécies exóticas, reflorestamento com nim, sucupira e pau-pombo, solo não submetido a reflorestamento, além de solo sob mata atlântica nativa que foi utilizada como padrão de comparação. Os tratamentos que apresentaram maior atividade microbiológica foram os solos reflorestados com espécies nativas e exóticas. A hidrólise de FDA mostrou-se eficaz como indicador da atividade microbiológica nos solos submetidos a reflorestamentos.

Palavra-chave: mata atlântica, espécies exóticas, bioindicador, microbiologia do solo.

ABSTRAT

The microbial activity has been used as a bioindicator of soil quality. In this paper the method of fluorescein diacetate hydrolysis (FDA) was used to determine the microbial activity of a soil submitted to four treatments: reforestation with native species of Atlantic forest, reforestation with exotic species, reforestation with neem, sucupira and stick-pigeon, soil not submitted to reforestation and the soil of native Atlantic forest that were used as comparison patterns. The treatments that presented higher microbial activity were the soils reforested with native and exotic species. The method of FDA was effective as an indicator of microbial activity in soils submitted to reforestations.

Key words: atlantic forest, exotic species, bioindicator, soil microbiology.

INTRODUÇÃO

O solo, em seu estado natural, encontra-se coberto pela vegetação, que o protege da erosão e contribui para manter o equilíbrio entre os fatores de sua formação e aqueles que provocam sua degradação. O rompimento dessa relação provoca alterações físicas, químicas e biológicas, as quais, se não forem adequadamente monitoradas e controladas, levam à queda de produtividade e à degradação do ecossistema (SIQUEIRA et al., 1994).

A diversidade e quantidade de microrganismos do solo são imensas. A massa microbiana é responsável direta e indiretamente por processos microbiológicos e bioquímicos diversos, os quais exercem enorme influência na produtividade e sustentabilidade dos ecossistemas terrestres SIQUEIRA et al. (1994). Os microrganismos ocupam 5% do espaço poroso do solo e a ocorrência de um microorganismo em determinado solo é a expressão da sua reação às condições ambientais, dentro dos limites da bagagem genética possuída pelo microrganismo.

O desmatamento é uma ação antrópica que provoca impacto direto na atividade microbiológica do solo, influencia nas alterações químicas, físicas e biológicas, além da perda da matéria orgânica. A mata atlântica é um dos ecossistemas impactados pelo desmatamento. Segundo LANDIM (1996), em Sergipe, como todo o Nordeste, em geral, as áreas

¹Graduanda de Biologia, Bolsista de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq), Universidade Federal de Sergipe.

²Engenheiro Florestal, Doutor, Pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Tabuleiros Costeiros. Av. Beira Mar, 3250, CP 44. 49001-970, Aracaju, SE.

³Engenheiro Agrônomo, PhD, Pesquisador da EMBRAPA Tabuleiros Costeiros, Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq. Autor para correspondência. E-mail: jcosta@cpac.embrapa.br.

remanescentes são pequenas e extremamente fragmentadas com grande impacto antrópico. No entanto, os solos degradados podem ser recuperados e se isto ocorrer reduzirá o impacto de várias maneiras, como a redução da degradação de outros recursos como fauna, flora e água. Os microrganismos e suas funções contribuem para isso e são essenciais para a reabilitação de solos degradados e o restabelecimento da cobertura vegetal.

O reflorestamento é uma prática muito importante, pois além de promover a agregação e alteração microclima do solo, contribui para o aumento da atividade microbiológica e o estabelecimento da funcionalidade do sistema solo-planta-organismo. A atividade microbiana é um fator que exerce sem dúvida uma grande influência na conservação (SIQUEIRA et al., 1994).

A atividade microbiológica inclui todas as reações metabólicas celulares, suas interações e seus processos bioquímicos mediados ou conduzidos pelos organismos do solo (SIQUEIRA et al., 1994). A hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) é um novo método que avalia a atividade hidrolítica indiscriminada (SCHNÜNER & ROSSWALL, 1982). Segundo ALENCAR & COSTA (2000); COSTA (1995); COSTA et al. (1996 e 2000), o FDA é hidrolisado por várias enzimas (lípsases, proteases e esterases), presente nos microrganismos e, por esse motivo, tem sido usado para avaliar a atividade microbiana nas amostras de solo. Este trabalho teve como objetivo determinar a atividade microbiológica de um solo submetido a reflorestamentos por meio do método de hidrólise de diacetato de fluoresceína.

MATERIAL E MÉTODOS

As coletas de solo foram realizadas em abril de 2002, no município de Umbaúba, em áreas com seis anos de reflorestamento, entre as coordenadas 11°06' de longitude sul e 37°32' de longitude oeste, em condições de tabuleiros costeiros, em solos Pódzólico Amarelo Distrófico (SIQUEIRA et al., 2002).

O solo foi avaliado em cinco tratamentos: a) solo reflorestado com espécies nativas da mata atlântica: jatobá (*Hymenaea courbail*), jacarandá (*Jacaranda sp.*), pau-pombo (*Tapirira guianensis*), pau-ferro (*Caesalpinia ferrea*), sucupira (*Bowdichia virgilioides*), maria-farinha (*Stryphonodendron sp.*), araticum (*Annona sp.*), amescla (*Protium heptaphyllum*), murici (*Byrsonima sericea*), e tamboil (*Enterolobium contortisiliquum*); b) espécies exóticas: mogno-africano (*Khaya ivorensis*), nim (*Azadirachta indica*), contas-de-rosário (*Adenantha pavonina*), *Eucaliptus cloeriana*, *E.*

citrodora, *E. terecornis*, *E. pellita*, *E. camaldulensis* e *E. brassiana*; c) solo reflorestado com nim (*Azadirachta indica*), sucupira (*Bowdichia virgilioides*) e pau-pombo (*Tapirira guianensis*); d) solo não reflorestado; e) o solo sob mata atlântica nativa que foi utilizada como referência.

Para a amostragem do solo, nos tratamentos de reflorestamento com espécies exóticas, nativas, bem como no solo não reflorestado e sob mata atlântica nativa, foram demarcados nove pontos fixos representativos de cada espécie plantada em cada área. Em um metro de distância destes pontos fixos foram coletadas duas sub-amostras em lados opostos, que após a homogeneização, constituíram-se de uma amostra composta para cada ponto de coleta. Já na área de reflorestamento com nim, sucupira e pau-pombo que estava dividida em parcelas, foi escolhida a fileira central de cada parcela e foram coletadas três sub-amostras de pontos aleatórios circunscritos a um metro de distância do tronco das árvores teste. Após a homogeneização as sub-amostras constituíram uma amostra composta.

Todas as amostragens foram efetuadas na profundidade de 0-10 cm com o auxílio de um trado. As amostras foram colocadas em sacos de polietileno, etiquetados e levadas ao laboratório onde se iniciou o processo de análise, dentro do período de 24 hs.

A atividade microbiológica foi determinada pelo método de hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) descrito por SCHUNER & ROSSWALL (1982) e adaptado por COSTA (1995). Para tanto, foram utilizados 8g de solo de cada amostra e colocados em erlenmeyers com capacidade de 250ml, nos quais foram adicionados 50ml de solução tampão fosfato de potássio, pH 7,5 e agitados por 40 minutos. Em seguida, foi adicionada uma alíquota de 250ml de solução estoque de FDA nos erlenmeyers, os quais foram agitados durante 60 minutos a 125rpm. Foram então retirados 2ml da suspensão sobrenadante, aos quais foram adicionados 2ml de acetona para paralisar a reação de hidrólise. A suspensão foi centrifugada durante 10 minutos e, em seguida, foi observada a densidade ótica em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490nm, para a determinação da quantidade de fluoresceína hidrolisada. Com os dados obtidos, foi elaborada uma curva padrão e calculada a quantidade de fluoresceína hidrolisada em 8g de solo por 60 minutos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os solos reflorestados com espécies nativas e exóticas foram os tratamentos que apresentaram

maior atividade microbiológica. Esses tratamentos apresentaram 118,73 e 112,40mg FDA hidrolisada / 60min 8g⁻¹ de solo, respectivamente (Figura 1).

A atividade microbiológica foi maior no tratamento com espécies nativas, provavelmente por este apresentar maior acúmulo de matéria orgânica na superfície do solo. Ressalta-se que o tratamento com espécies nativas foi reflorestado com nove gêneros diferentes de árvores apresentando uma maior biodiversidade vegetal em relação aos outros tratamentos. No solo reflorestado com espécies exóticas, utilizaram-se quatro gêneros de árvores com predominância para os eucaliptos. Segundo GODOI (2001), os solos degradados sob revegetação com espécies nativas apresentam dados químicos e microbiológicos muito próximos aos do solo preservados sob mata nativa, e são superiores aos solos reflorestados com *Eucalyptus sp.*

O trabalho de GODOI (2001) também reforça a importância da utilização de espécies nativas em trabalhos de recuperação de solos degradados. No presente trabalho, o solo reflorestado com espécies nativas e exóticas alcançou no final de seis anos de reflorestamento, 74,88% e 70,88% do valor máximo encontrado na mata nativa (158,56 mg FDA hidrolisada /60min/8g de solo) que foi considerada como padrão nas condições deste estudo.

O tratamento do solo reflorestado com nim, sucupira e pau-pombo apresentou um valor intermediário de 52,63mg FDA hidrolisada/60min/8g de solo. Já o solo não reflorestado

apresentou atividade microbiológica próximo de zero (Figura 1).

Este trabalho indica ainda que o solo não reflorestado apresentou exaustão biológica. De fato, um solo sem cobertura vegetal torna-se um deserto para os microrganismos, por não ter matéria orgânica, sua fonte de energia e nutrientes (SIQUEIRA et al., 1994).

O método de hidrólise de FDA mostrou-se estável e promissor no seu uso como bioindicador do sucesso de sistemas restaurados. Outros autores já testaram o sucesso deste método, como ALENCAR & COSTA (2000) que o utilizaram para avaliar o impacto da fungigação na atividade microbiológica de solos e verificaram que a aplicação de fungicidas via água na irrigação reduziu a atividade microbiológica nos solos cultivados. Já no trabalho de YOU & SIVASITHAMPARAM (1994), o método de FDA serviu para indicar a supressividade à *Phytophthora cinnamomi* em plantações de abacate na Austrália. COSTA et al. (1996 e 2000) comprovaram, através deste método, a capacidade de compostos bioativados em controlar a podridão radicular de *Phytophthora* no abacateiro por indução de supressividade. GHINI et al. (1998) também monitoraram com sucesso a supressividade à *Rizoctonia solani* de substratos orgânicos, utilizando como indicador o mesmo método de FDA. Mais recentemente, GODOI (2001) utilizou o método de diacetato de fluoresceína e verificou ser um instrumento eficaz como indicador da qualidade de solos de áreas degradadas, recuperadas e nativas nos cerrados brasileiros.

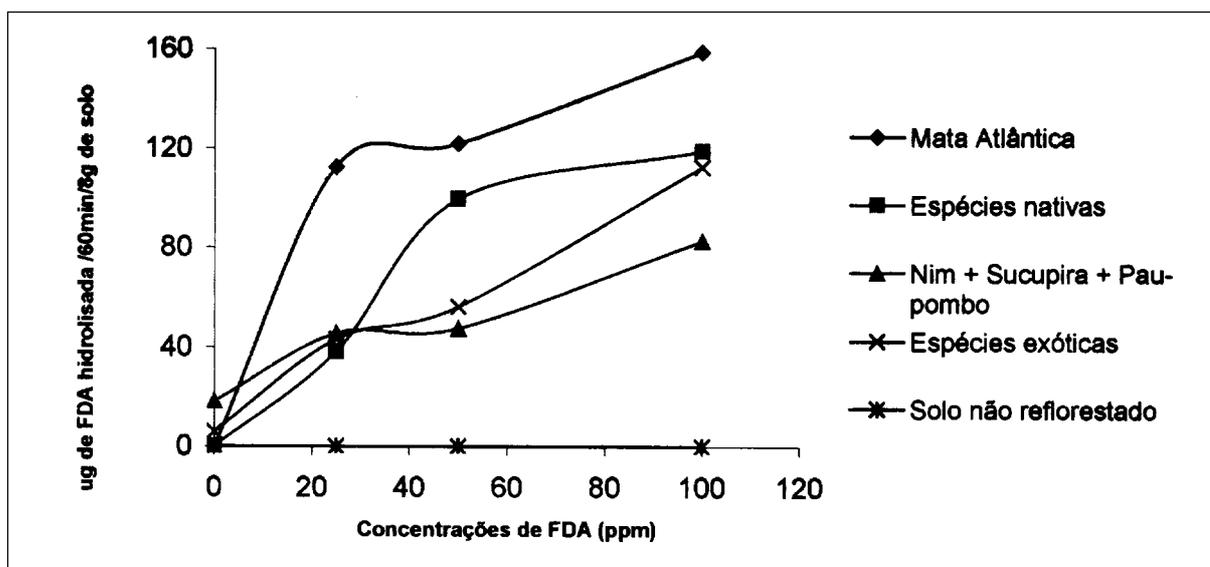


Figura 1 - Relação entre a quantidade de diacetato de fluoresceína (FDA) hidrolisada/60min/8g de solo e as diferentes concentrações padrões de FDA.

CONCLUSÃO

O método de diacetato de fluoresceína, mostrou-se eficiente como bioindicador de solos submetidos a reflorestamentos. Sugere-se que este método seja inserido em estudos posteriores de dinâmica da ecologia microbiana dos solos do Nordeste, ou ainda em estudos de monitoramento ambiental. O melhor tratamento para recuperação da vida biológica de solos degradados foi o reflorestamento com espécies nativas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALENCAR, F.C.N.; COSTA, J.L.S. Impacto da fungigação na biomassa e atividade microbiológica dos solos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 33., 2000, Belém. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, (suplemento), 2000. p.359.
- COSTA, J.L.S. **Inducing suppressiveness to Phytophthora root of avocado by using biochanced mulches**. 1995. 154f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - University of California, CA.
- COSTA, J.L.S. et al. Investigation on some of the mechanisms by which bioenhanced mulches can suppress Phytophthora root rot of avocado. **Microbiological Research**, Jena, v.151, p.183-192, 1996.
- COSTA, J.L.S. et al. Biological control of Phytophthora root of avocado with microorganism grown in organic mulches. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.31, n.4, p.239-246, 2000.
- GHINI, R. et al. Método de hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) como indicador de atividade microbiana no solo e supressividade a *Rhizoctonia solani*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.24, n.3/4, p.239-241, 1998.
- GODOI, L.C.L. **Propriedades microbiológicas de solos em áreas degradadas e recuperadas na região dos cerrados goianos**. 2001. 87f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Goiás.
- LANDIM, M.L.F. Composição e estrutura da Mata Atlântica de Sergipe. In: ENCONTRO DE MATA ATLÂNTICA DE SERGIPE: "A MATA ATLÂNTICA DO NORDESTE", 1996, Aracaju, SE. **Resumos...** Aracaju : EMBRAPA CPATC/UFS, 1996. p.77-84.
- SCHUNER, J.; ROSSWALL, T. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. **Applied and Environmental Microbiology**, Washigton, v.43, p.1256-1261, 1982.
- SIQUEIRA, J.O. et al. **Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental**. Brasília : EMRAPA-SPI, 1994. p.7-81.
- SIQUEIRA, E.R. et al. Comportamento inicial de espécies florestais exóticas na região da Mata Atlântica de Sergipe. **Árvore**, Viçosa, v.26, n.1, p13-17, 2002.
- YOU, M.P.; SIVASITHAMPARAM, K. Hydrolysis of fluorescein diacetate in an avocado plantation mulch suppressive to *Phytophthora cinnamomi* and its relationship with certain biotic and abiotic factors. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v.26, n.10, p.1355-1361, 1994.