

# AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA E DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE SOLO SUBMETIDO AO CULTIVO DE CANA-DE- AÇÚCAR



**Eduardo Bosco Mattos Cattony**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Engenharia Ambiental

ORIENTADORA: Dra. Rosana Filomena Vazoller.

DEDALUS - Acervo - EESC



31100017299

Serviço de Pós-Graduação EESC/USP

**EXEMPLAR REVISADO**

Data de entrada no Serviço: 29 / 03 / 01

Ass.: *Acunv*

|        |            |
|--------|------------|
| Class. | TESE-EEESC |
| Cult.  | 1442       |
| Tombo  | 0074/01    |

st 1170944

AVALIÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA E  
DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE  
SOLO SUBMETIDO AO CULTIVO DE CANA-DE-  
AÇÚCAR

Eduardo Bosco Mattos Cattony

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento  
da Informação do Serviço de Biblioteca – EEESC/USP

Cattony, Eduardo Bosco Mattos  
C369u Avaliação da diversidade microbiana e das  
características físico-químicas de solo submetido ao  
cultivo de cana-de-açúcar / Eduardo Bosco Mattos  
Cattony. -- São Carlos, 2001.

Dissertação (Mestrado) -- Escola de Engenharia de  
São Carlos-Universidade de São Paulo, 2001.

Área: Ciências da Engenharia Ambiental.

Orientador: Profa. Dra. Rosana Filomena Vazoller.

1. Cana-de-açúcar. 2. Microbiota do solo.
  3. Actinomicetos. 4. Técnicas moleculares. 5. DGGE.
- I. Título.

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

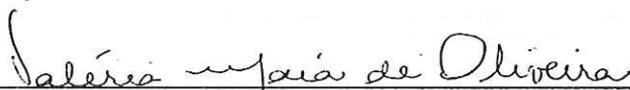
Candidato: Bacharel **EDUARDO BOSCO MATTOS CATTONY**

Dissertação defendida e aprovada em 05-03-2001  
pela Comissão Julgadora:



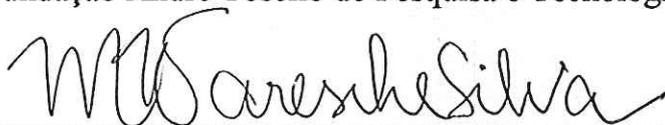
---

Doutora **ROSANA FILOMENA VAZOLLER (Orientadora)**  
(Fundação André Tosello de Pesquisa e Tecnologia)



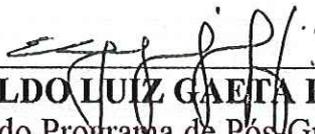
---

Doutora **VALÉRIA MAIA DE OLIVEIRA**  
(Fundação André Tosello de Pesquisa e Tecnologia)



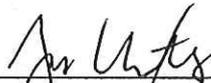
---

Doutora **MARIA BERNADETE AMÂNCIO VARESCHE SILVA**  
(Pesquisadora FAPESP- Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo)



---

Prof. Doutor **EVALDO LUIZ GAETA ESPÍNDOLA**  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação  
em Ciências da Engenharia Ambiental



---

**JOSÉ CARLOS A. CINTRA**  
Presidente da Comissão de Pós-Graduação da EESC

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais.

Bernardino e Maria Tereza Cattony.

## AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Rosana Filomena Vazoller pela constante orientação e o efetivo ensinamento durante o desenvolvimento deste trabalho.

A Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida, como também, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento da pesquisa, e à Universidade de São Paulo (USP), por acreditar na necessidade de qualificar docentes.

A Fundação André Tosello pelas culturas microbianas fornecidas, e nas pessoas do Dr. Gilson Manfio e Valéria Maia, que me introduziram os conceitos sobre as técnicas em "Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante".

A Dr. Maria Bernadete pelo auxílio nas horas difíceis dentro do laboratório.

Prof. Woodrow pelo auxílio na metodologia da avaliação da temperatura do solo.

Aos funcionários do Laboratório de Processos Biológicos da EESC.

Aos colegas, companheiros do dia-a-dia no laboratório de Processos Anaeróbios, pelo árduo trabalho, pela aprendizagem e reciclagem conjunta.

Agradeço também a Nélia, pessoa de fundamental importância no meu amadurecimento como pessoa e como profissional.

Finalmente, agradeço aos funcionários do CRHEA pelo carinho e atendimento de qualidade.

## SUMÁRIO

|  |            |
|--|------------|
| <b>LISTA DE FIGURAS</b> .....  | <b>i</b>   |
| <b>LISTA DE TABELAS</b> .....  | <b>iii</b> |
| <b>LISTA DE SIGLAS</b> .....   | <b>iv</b>  |
| <b>RESUMO</b> .....  | <b>vi</b>  |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | <b>vii</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>1</b>   |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....  | <b>6</b>   |
| <b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....  | <b>7</b>   |
| 3.1. Práticas do cultivo da cana-de-açúcar: Alterações e Impactos no Ambiente.....                                       | 7          |
| 3.1.1. Impactos da queima da cana-de-açúcar sobre a atmosfera.....   | 16         |
| 3.1.2. Impactos da água residuária gerada na indústria sucro-alcooleira: a questão da disposição da vinhaça no solo..... | 17         |
| 3.2. Avaliação da microbiota do solo: a importância das técnicas moleculares   | 19         |
| 3.2.1. PCR (“Polymerase chain reaction”).....  | 21         |
| 3.2.2. O DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).....   | 26         |
| 3.2.3. Populações de actinomicetos como componentes da comunidade microbiana nos solos.....                              | 29         |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | <b>32</b>  |
| 4.1. Área de Estudo.....   | 33         |
| 4.2. Coleta das amostras de solo.....  | 34         |
| 4.3. Medidas de temperatura no solo.....   | 35         |
| 4.4. Análises físico-químicas do solo.....   | 36         |
| 4.5. Índice pluviométrico.....   | 36         |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 4.6.      | Organismos indicadores.....  | 37        |
| 4.7       | Eletroforese em gel de agarose.....  | 38        |
| 4.8       | Extração de DNA do solo.....   | 39        |
| 4.9       | Purificação do DNA.....  | 41        |
| 4.10      | PCR.....   | 43        |
| 4.11.     | DGGE.....  | 45        |
| <b>5.</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>   | <b>46</b> |
| 5.1.      | Condições da área estudada: temperatura, pluviosidade, composição do solo..... | 46        |
| 5.2.      | Composição microbiana do solo – Os estudos com PCR e DGGE.....                 | 60        |
| <b>6.</b> | <b>CONCLUSÕES.....</b>   | <b>67</b> |
| <b>7.</b> | <b>RECOMENDAÇÕES.....</b>  | <b>69</b> |
| <b>8.</b> | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>   | <b>70</b> |
|           | <b>APÊNDICE.....</b>   | <b>82</b> |

**LISTA DE FIGURAS**

|            |   |    |
|------------|---|----|
| FIGURA 1.  | Curvas de variação do estoque de carbono orgânico total.....  | 11 |
| FIGURA 2.  | Desnaturação da molécula de DNA.....  | 22 |
| FIGURA 3.  | Anelamento dos primers.....   | 22 |
| FIGURA 4.  | Extensão da nova fita de DNA.....   | 23 |
| FIGURA 5.  | Moléculas de DNA resultantes 5 ciclos depois da reação de PCR   | 24 |
| FIGURA 6.  | Rendimento da amplificação de DNA após 30 ciclos da reação de PCR.....  | 25 |
| FIGURA 7.  | Diferentes seqüências de pares de bases podem ser separados pela técnica do DGGE.....                                   | 26 |
| FIGURA 8.  | Dissociação da molécula de DNA no gel desnaturante do DGGE  | 27 |
| FIGURA 9.  | Etapas operacionais do trabalho.....  | 33 |
| FIGURA 10. | Anel de Kopeck.....   | 34 |
| FIGURA 11. | Valores da temperatura do solo, em diferentes profundidades, do canal localizado no Sítio Paraíso exposto à queima..... | 47 |
| FIGURA 12. | Valores das temperaturas máximas e mínimas dos dias 27 a 29 de Novembro de 1999, Sítio Paraíso.....                     | 47 |
| FIGURA 13. | Valores das temperaturas máximas e mínimas no mês de Dezembro de 1999 no Sítio Paraíso.....                             | 48 |
| FIGURA 14. | Valores das temperaturas máximas e mínimas no mês de Janeiro de 2000 no Sítio Paraíso.....                              | 48 |
| FIGURA 15. | Valores das temperaturas máximas e mínimas no mês de Fevereiro de 2000 no Sítio Paraíso.....                            | 48 |
| FIGURA 16. | Valores das temperaturas máximas e mínimas entre os dias 1 e 28 de Março de 2000 no Sítio Paraíso.....                  | 49 |

## Lista de Figuras

---

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| FIGURA 17 | Valores das medidas pluviométricas nos períodos amostrados, no Sítio Paraíso.....   | 50 |
| FIGURA 18 | Valores de pH e comportamento da disponibilidade dos elementos no solo.....   | 55 |
| FIGURA 19 | Gel de agarose 1% com amostras de $\lambda$ DNA e DNA purificado da comunidade bacteriana presente no solo de mata e de canavial..... | 61 |
| FIGURA 20 | Gel de agarose 1% com amostras de produto de PCR com primers do Domínio Bacteria e do grupo Actinomicetos.....                        | 62 |
| FIGURA 21 | Gel de DGGE (55-57%) com amostras do solo de cana amplificando fragmento de actinomicetos.....  | 63 |
| FIGURA 22 | Fotos dos géis de DGGE com amostras de DNA para o Domínio Bactéria.....   | 66 |

**LISTA DE TABELAS**

|            |   |    |
|------------|---|----|
| TABELA 1.  | Temperatura do solo queimado.....   | 13 |
| TABELA 2.  | Alteração do regime térmico do solo a diferentes profundidades.                   | 14 |
| TABELA 3.  | Comparação das classes de severidade de fogo por temperatura..                    | 15 |
| TABELA 4.  | Características físico-químicas da vinhaça.....                                   | 18 |
| TABELA 5.  | Análise elementar expressa em matéria seca.....                                   | 30 |
| TABELA 6.  | Organismos investigados neste estudo.....   | 38 |
| TABELA 7.  | Concentração de agarose e resolução de fragmentos de DNA.....                     | 39 |
| TABELA 8.  | Primers usados nos experimentos com PCR.....                                      | 44 |
| TABELA 9.  | Número de veranicos no período (Dezembro de 1999 a Março de 2000).....            | 51 |
| TABELA 10. | Granulometria dos solos de cana-de-açúcar e mata 60 anos.....                     | 53 |
| TABELA 11. | Valores dos parâmetros analisados dos solos de cana-de-açúcar e mata 60 anos..... | 53 |
| TABELA 12. | Composição dos micronutrientes dos solos de cana-de-açúcar e mata 60 anos.....    | 53 |
| TABELA 13. | Disponibilidade de P (fósforo) no solo de diferentes culturas.....                | 57 |
| TABELA 14. | Limites de interpretação de classes para o pH e para a saturação por bases.....   | 57 |
| TABELA 15. | Limites de interpretação de classes para teores de $Ca^{2+}$ e $Mg^{2+}$ ....     | 57 |
| TABELA 16. | Limites de interpretação de classes para teores de Cu, Fe, Mn e Zn.....           | 57 |

**LISTA DE SIGLAS**

- 4MC0** Amostra da superfície do solo do canavial após quatro meses da queima.
- 4MC3** Amostra do solo de canavial a 3,0cm de profundidade após quatro meses da queima.
- 4MC6** Amostra do solo de canavial a 6,0cm de profundidade após quatro meses da queima.
- C0** Amostra da superfície do solo de canavial.
- C3** Amostra do solo de canavial a 3,0cm de profundidade.
- C6** Amostra do solo de canavial a 6,0cm de profundidade.
- CQ0** Amostra da superfície do solo de canavial após a queima.
- CQ3** Amostra do solo de canavial após a queima a 3,0 cm de profundidade.
- CQ6** Amostra do solo de canavial após a queima a 6,0 cm de profundidade.
- CM** *Clavibacter michigalensis*.
- CTC** Capacidade de troca catiônica
- DGGE** Denaturing Gradient Gel Electrophoresis.
- DMSO** Sulfóxido de dimetila
- DNA** Ácido desoxirribonucleido.
- DNA<sub>r</sub>** DNA ribossômico.
- dNTP's** 2-deoxi guanosina, adenina, timina e citosina trifosfato
- ds** Dias secos.
- EC** *Escherichia coli*.
- F** Forward.
- GC** Sequência rica em G+C.
- LP** *Lactobacillus plantarum*.
- M** Saturação do alumínio
- M0** Amostra da superfície do solo da mata *60 anos*.
- M3** Amostra do solo da mata *60 anos* a 3,0 cm de profundidade.
- M6** Amostra do solo da mata *60 anos* a 6,0 cm de profundidade.
- ML** *Micrococcus luteus*.
- PB** Pares de base.
- pc** Períodos contínuos sem precipitação.

## Lista de Figuras

---

- PCR** Polymerase chain reaction.  
**R** Reverse.  
**RNA** Ácido ribonucléico.  
**RNA<sub>r</sub>** RNA ribossômico.  
**S** Soma das bases (Ca+Mg+K)  
**SVL** *Streptomyces violaceoruber*.  
**SVR** *Streptomyces viridochromogenes*.  
**S'** Superfície.  
**V** Saturação de bases (soma das bases/ CTC)

## RESUMO

CATTONY, E. B. M. (2001) Avaliação da diversidade microbiana e das características físico-químicas de solo submetido ao cultivo de cana-de-açúcar. São Carlos, 2001, 79p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

A utilização de técnicas moleculares têm facilitado o estudo de comunidades bacterianas complexas no ambiente. O presente trabalho teve como objetivo utilizar a técnica DGGE para avaliação dos efeitos do aumento da temperatura, causado pela queima de um canavial, na estrutura da comunidade bacteriana de solo, com ênfase ao grupo dos actinomicetos. Foram coletadas amostras de solo em diferentes profundidades, antes e depois da queima, e dados físico-químicos e climáticos associados. O DNA da comunidade bacteriana foi amplificado utilizando conjunto de *primers* específicos para o Domínio Bacteria e para o grupo de actinomicetos, e os produtos de amplificação analisados por DGGE. Resultados obtidos para as populações de actinomicetos não foram conclusivos. Apesar da variação dos parâmetros físico-químicos do solo provocadas pela queima, os padrões de bandas obtidos com os *primers* para o Domínio Bacteria, apresentaram-se uniformes. Sendo assim, nas condições de estudo deste trabalho, os resultados obtidos não revelaram alterações na estrutura da comunidade bacteriana do solo de canavial depois da queima.

**Palavras chave:** Cana-de-açúcar, microbiota do solo, actinomicetos, técnicas moleculares, DGGE.

**ABSTRACT**

CATTONY, E. B. M. (2001). Evaluation of microbial diversity and physic-chemicals parameters of sugarcane plantation soil. São Carlos, 2001, 79p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

The utilization of molecular techniques has facilitated the study of complex bacterial communities in the environment. The present study aimed at using DGGE technique to evaluate the effect of temperature variation, caused by sugar-cane plantation burn, in the soil bacterial community structure emphasizing the actinomycete group. Soil samples from different depths, were collected before and after the burn, as well as physical-chemical and climatic associated data. The bacterial community DNA was amplified using a specific primer set and the amplification products analyzed by DGGE. The results obtained for the actinomycete populations were not conclusive. Despite the variation of the soil parameters caused by the burn, the band patterns obtained used in this study were uniform. Therefore, under the conditions used in this study, the results obtained did not show any alteration in the structure of soil bacterial community associated with sugar-cane plantation after the burn.

**Keywords:** DGGE, microbial community of soil, actinomycetes, molecular techniques, sugar cane.

## 1. INTRODUÇÃO

O governo brasileiro criou o Pro-Álcool através do Decreto Federal número 76.593 de 14 de Novembro de 1975, um programa que visou a organização de um sistema agrícola voltado para a produção de cana-de-açúcar e de implantação de usinas para a geração de etanol (álcool) como combustível alternativo aos combustíveis derivados do petróleo. Por ser o álcool menos agressivo ao meio ambiente, a implementação da agroindústria canavieira revelou-se como um possível grande passo para o desenvolvimento energético e sustentável nacional (CETESB, 1993).

Até 1975 eram produzidos no país cerca de 500 milhões de litros de álcool por ano, utilizados na fabricação de bebidas e açúcar, além da indústria farmacêutica. Após a criação do Pro-álcool, já em 1976 o álcool passou a ser adicionado à gasolina dos automóveis, e em 1979 foram fabricados os primeiros veículos movidos por esse combustível (KIRCHHOFF, 1991).

Por volta de 1985, quando o programa já estava em operação por dez anos, os resultados mostravam que US\$ 6,5 bilhões haviam sido investidos na produção de 50 bilhões de litros (13 bilhões de galões) de etanol, 500.000 empregos tinham sido criados, 2,5 milhões de veículos utilizavam etanol puro e a gasolina dos postos era acrescida de 20% de etanol (GOVERNO, 2000).

Logo no início da produção dos automóveis movidos a etanol, ocorreu uma elevação na produção de álcool para doze bilhões de litros anuais. No ano de 1989, a área da cana-de-açúcar colhida em todo o Brasil era de 4,1 milhões de hectares, sendo que o Estado de São Paulo sozinho contribuía com mais de 50% da produção nacional (KIRCHHOFF, 1991).

Atualmente, o Brasil possui tecnologia e equipamentos capazes de manter uma produção anual de 16 bilhões de litros de etanol, o que tem resultado na

exportação desse parque tecnológico alcooleiro. O Pró-Álcool teve uma notável contribuição aos esforços necessários à proteção ambiental, tendo propiciado uma grande redução no nível de monóxido de carbono liberado pelos veículos automotores pela substituição da gasolina. Um grande número dos automóveis em circulação no Brasil ainda é movido a etanol. Contudo, no período compreendido entre 1985 e 1999 ocorreu significativa redução da produção de veículos novos movidos a álcool, que decresceu de 96% do total de automóveis produzidos para 0,5% (GOVERNO, 2000).

Da mesma forma que o cultivo da cana-de-açúcar traz benefícios, uma alta diversidade de problemas também está relacionada a ele. KIRCHHOFF (1991) indicou alguns prejuízos ao meio ambiente advindos da monocultura sucro-alcooleira, como por exemplo, a perda de extensas áreas nativas, as conseqüências do uso de agroquímicos e pesticidas, a não rotatividade de culturas e os problemas relacionados com a colheita da cana-de-açúcar, como a queima prévia da área plantada.

Pode-se enumerar alguns dos efeitos deletérios das áreas cultivadas quando da prática da queima, destacando-se alterações no solo, tais como desnudação e elevação da temperatura, erosão, lixiviação, déficit hídrico, oxidação de compostos orgânicos, alcalinização, perda de nutrientes para a atmosfera, redução da biota na camada superior e aceleração do processo de mineralização (OLIVEIRA, 1994).

Em relação à biota do solo, verifica-se que os microorganismos são diretamente afetados pelos fatores anteriormente citados. Os microorganismos do solo estão intimamente relacionados a uma série de funções orgânicas do sistema de captação e transformação dos nutrientes para os vegetais, sem considerar todos os demais papéis atribuídos a esses seres vivos microscópicos no ciclo da vida e manutenção do meio ambiente, como por exemplo fixação de nitrogênio e degradação de compostos recalcitrantes (MANUAL GLOBAL DE ECOLOGIA, 1996).

Quando fatores não naturais alteram um ou mais componentes de um microecossistema, conseqüentemente a funcionalidade do mesmo é comprometida. Este desajuste funcional muitas vezes ultrapassa a barreira do invisível e afeta até

mesmo o próprio homem, como por exemplo, no processo de desertificação do solo causado por desmatamento (ODUM, 1993).

O estudo da diversidade e da estrutura funcional de um microecossistema é fundamental para o desenvolvimento sustentável. A água potável e solos férteis são colocados como prioridades ambientais para o próximo século. O desenvolvimento sem critérios de sustentabilidade, tanto das nações ricas como das pobres, traz como consequência grave a degradação do solo, das florestas, da água e do ar do Planeta, dos quais toda vida depende (MANUAL GLOBAL DE ECOLOGIA, 1996).

No presente trabalho, o solo cultivado para a produção da cana-de-açúcar foi escolhido como o ecossistema de interesse. A identificação da microbiota e dos processos biológicos são essenciais para a preservação de qualquer solo. Assim, os esforços para ampliar o conhecimento sobre a diversidade microbiana e filogenia dos microrganismos, em especial aqueles do Domínio Bacteria, são fundamentais para a exploração de novos isolados de interesse ambiental e industrial (MANFIO, 2000), bem como para monitorar as alterações dos diferentes tipos de solos.

A ênfase dada à sistemática molecular nos últimos anos parece ser uma resposta mais rápida ao entendimento da diversidade bacteriana, somando-se, sem dúvida, as práticas tradicionais para a compreensão da estrutura e função fisiológica das células procarióticas. A taxonomia tradicional não deve prevalecer, pois a identificação de espécies não é meramente uma questão de denominar uma espécie bacteriana, mas de situá-la, sobretudo, em seu contexto ecológico. Análises fenotípicas e genotípicas combinadas são fundamentais no esclarecimento da diversidade bacteriana (ROSADO *et al.*, 1997).

Técnicas moleculares vêm sendo utilizadas para a análise de toda comunidade bacteriana, incluindo organismos cultivados e não-cultivados da comunidade. Trabalhos com amostras de solo foram e continuam sendo realizados por diferentes pesquisadores, cabendo citar alguns deles:

➤ NINER *et al.* (1996) estudaram seqüências de RNAr 16S, via PCR, de actinomicetos isolados de nódulos da raiz de *Casuarina equisetifolia* no México;

- STEPHEN *et al.* (1996) usaram a técnica PCR para estudar a diversidade, no solo e em sedimentos do mar, do gene RNAr 16S, seqüência relacionada ao subgrupo- $\beta$  de bactérias oxidadoras de amônia;
- TORSVIK *et al.* (1998) usaram a combinação de duas técnicas, a técnica do PCR e a do DGGE, para obter informações sobre mudanças numéricas de populações dominantes de bactérias no solo e em sedimentos;
- DUARTE *et al.* (1998) extraindo RNA ribossômico e DNA genômico, estudaram a diversidade bacteriana na comunidade de amostras de solo;
- GELSOMINO *et al.* (1999) também utilizaram a combinação destas duas técnicas, PCR e DGGE, para estudar a similaridade entre comunidades bacterianas dominantes de solos de mesmo tipo;
- NÜSSLEIN & TIEDJE (1999) usando três técnicas diferentes de biologia molecular, fracionamento do DNA pelo conteúdo de guanina e citosina, amplificação do DNA via PCR com posterior uso da técnica ARDRA (digestão dos clones de DNA por enzimas de restrição, a fim de gerar um padrão de bandas em um gel de agarose) e análise filogenética de clones específicos através de um seqüenciamento. Então, estudaram as variações dentro da comunidade bacteriana de um solo submetido à troca da mata natural por pastagem;
- OLIVEIRA (1999) utilizou uma abordagem molecular direta e rápida, baseada no uso de sondas e *primers* específicos, para detectar e avaliar a diversidade de rizóbios em amostras de solo submetidas a diferentes práticas agrícolas.

O estudo sobre a diversidade microbiana foi bastante facilitado com o advento da técnica da "eletroforese em gel de gradiente desnaturante" - *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* - ou simplesmente DGGE. Com a técnica DGGE tem sido possível a diferenciação de duas linhagens de bactérias através da análise de padrões de bandas em um gel de gradiente desnaturante. HEUER *et al.* (1997) utilizaram esta nova técnica para estudar a comunidade de actinomicetos em amostras de solo, demonstrando quão útil e diversificada pode ser esta nova forma de abordagem. Desta forma o uso do DGGE vem sendo disseminado nos últimos anos, demonstrando seu valor não apenas na caracterização de comunidades complexas, como também para inferir afiliação filogenética dos membros de uma comunidade,

monitorar o isolamento de bactérias a partir de amostras ambientais, ou estudar a dinâmica de populações específicas em função de variações ambientais ou das condições operacionais de um sistema.

O presente trabalho teve como objetivo obter informações sobre a diversidade genética de comunidades bacterianas no solo cultivado com cana-de-açúcar de uma região do estado de São Paulo, mais especificamente, do município de Araraquara.

A técnica DGGE foi usada para resolver fragmentos do DNAr 16S amplificados via PCR (*"Polymerase Chain Reaction"* - Reação de Polimerização em Cadeia), e as condições locais do ecossistema foram avaliadas através da temperatura e índices de pluviosidade.

## 2. OBJETIVOS

### Objetivos gerais:

- Avaliar a influência da queima do canavial no aumento da temperatura do solo em diferentes profundidades;
- Avaliar a influência do cultivo da cana-de-açúcar nas características físico-químicas do solo;
- Utilizar a técnica *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE) na avaliação da comunidade bacteriana de amostras de solo submetido a atividades para o cultivo da cana-de-açúcar.

### Objetivo específico:

- Avaliar a presença do grupo de actinomicetos nas amostras de solo estudadas.

### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

A presente revisão sobre os temas abordados nessa Dissertação procurará focalizar a problemática do impacto das práticas agrícolas do cultivo da cana-de-açúcar, bem como da produção do álcool sobre o meio ambiente, em especial a microbiota do solo. Além disso, apresentará também resultados de pesquisas sobre a utilização das técnicas moleculares para a avaliação da diversidade microbiana ambiental, especialmente do solo, destacando a evolução das mesmas ao longo dos últimos anos e ressaltando aquela escolhida no trabalho experimental desse mestrado, a técnica DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), ou eletroforese em gel de gradiente desnaturante.

#### **3.1. Práticas do cultivo da cana-de-açúcar: Alterações e Impactos no Ambiente**

A regulamentação sobre impactos ambientais se deu com a Resolução CONAMA 01 de 23 de setembro de 1986, que enumerou algumas atividades que resultam em impactos ambientais no território nacional, bem como aquelas em potencial, e recomendou estudos necessários para o diagnóstico e avaliação dos mesmos (CETESB, 1988).

A constituição brasileira de 1988 garante o direito de todos ao meio ambiente ecologicamente equilibrado e essencial à sadia qualidade de vida, sendo considerado um impacto ambiental qualquer ação que altere este equilíbrio do meio. Além disso, ela conceitua o meio ambiente como “bem de uso comum do povo” e, dessa forma, não pode ser apropriado nem negociado (MACHADO, 1998).

Assim, todo complexo agroindustrial, inclusive o sucro-alcooleiro, deparou-se com a necessidade de realizar estudos prévios sobre impactos ambientais,

incluindo neste os aspectos físicos, biológicos e sócio-econômicos-culturais (MELLO, 1997).

A cana-de-açúcar foi descrita cientificamente pela primeira vez por Linneu em 1753, e recebeu o nome genérico de *Saccharum*. É uma planta herbácea da família das gramíneas e tem cinco espécies principais, a *Saccharum spontaneum* L. ou “cana selvagem”, que provavelmente possui espécies silvestres no continente asiático, a *Saccharum officinarum* L. ou “cana nobre”, a *Saccharum sinnensis* ou “cana chinesa”, a *Saccharum barberi jeswiet* ou “cana indiana” e a *Saccharum robustum jeswiet* ou “cana javanesa” (MELLO, 1997). Supõe-se que a planta originou-se em Nova Guiné ou na Índia (BASTOS *apud* MELLO, 1997) e dali disseminou-se. As chinesas e indianas são consideradas híbridas (*S. spontaneum* e *S. officinarum*).

A devastação da vegetação nativa substituindo-a por monoculturas, como a da cana-de-açúcar, sem nenhum programa governamental de reflorestamento e replantio, marcou o início da agressão ambiental pela indústria sucro-alcooleira em 1975 com a implementação do Programa Pró-Álcool (KIRCHHOFF, 1991).

Certos tratamentos agrícolas utilizados pelo setor podem ser rudimentares e de forte impacto ao meio ambiente, como por exemplo, o uso do fogo na pré-colheita da cana-de-açúcar.

A indústria sucro-alcooleira também constitui uma fonte de poluição ambiental, em função da água residuária gerada durante o processo de destilação do álcool, a vinhaça, que pode atingir corpos d'água e/ou solos (CETESB, 1988). A vinhaça possui elevado conteúdo de matéria orgânica, como será posteriormente apresentado.

As medidas de prevenção e solução à poluição do meio pelas atividades da indústria sucro-alcooleira se concentraram prioritariamente na remoção dos poluentes lançados nos corpos d'água, com menor atenção à prática da queima prévia do vegetal, antes do corte, e ao uso mais racional dos defensivos agrícolas (ou agrotóxicos ou agroquímicos) (KIRCHHOFF, 1991). Essas medidas têm tido como objetivo não somente a minimização dos impactos ambientais, mas também a possibilidade de co-geração de energia através da queima do bagaço e de parte da palha advinda do campo. Ainda, a utilização de sistemas de tratamento da vinhaça,

como a tecnologia da digestão anaeróbia de resíduos, foi uma das soluções nacionais mais atraentes (VAZOLLER, 1995). Porém, a vinhaça é ainda bastante aproveitada para enriquecer o solo para o plantio de cana-de-açúcar (MELLO, 1997).

O solo, sem dúvida, constitui o ambiente reservado à qualidade de um plantio. São suas características bióticas e abióticas as responsáveis pelas condições propícias ao desenvolvimento adequado, por exemplo, da cana-de-açúcar. Os componentes biótico (matéria orgânica e diferentes populações de seres vivos) e abiótico (minerais, conteúdo de água, temperatura, entre outros) estão intimamente ligados no solo, o qual, por definição, consiste de uma camada intemperizada da crosta terrestre com organismos vivos e os produtos da sua decomposição. A fração mineral contribui com menos da metade do volume total do solo, sendo originária da desintegração e decomposição das rochas com o decorrer do tempo. A matéria orgânica usualmente contribui com aproximadamente 3 a 6% do total. A porção "viva" do solo, incluindo pequenos animais e microorganismos, soma menos do que 1% de seu volume total. O restante, quase metade do volume total se deve a natureza porosa do solo (ALEXANDER, 1961).

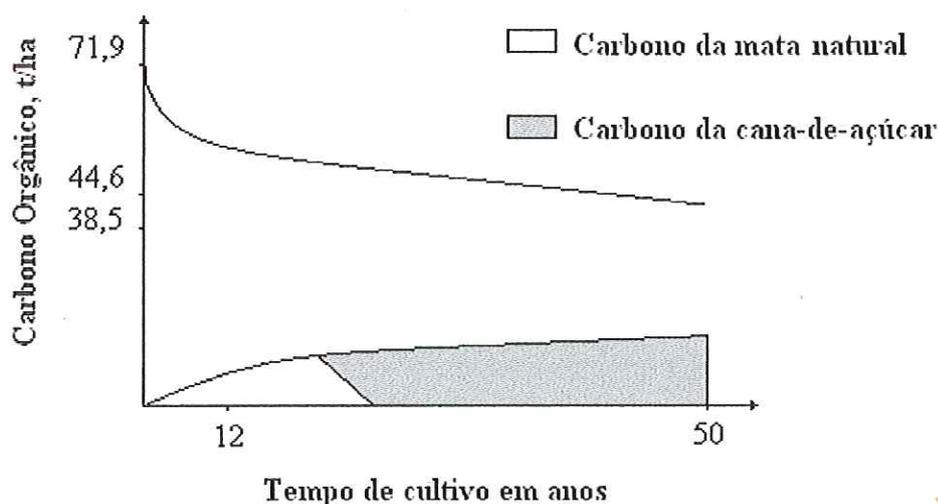
A camada superior mais superficial do solo é composta de restos de plantas e de animais que são reduzidos à matéria orgânica parcialmente degradada pelo processo de humificação. Esta fina camada pode ser considerada um tipo de subsistema ecológico, no qual os microrganismos (células procarióticas, na maioria bactérias, assim como fungos) trabalham em conjunto com pequenos artrópodes (ácaros e colêmbolos) para decompor a matéria orgânica (ODUM, 1993). Apesar de todas as partículas de solo apresentarem superfícies para o desenvolvimento de colônias de microorganismos, a argila e a matéria orgânica coloidal são as partículas que têm os menores diâmetros e, portanto, solos argilosos ricos em matéria orgânica apresentam uma maior área superficial para interações com os microorganismos e seus respectivos produtos. As interações da argila e das substâncias húmicas com os microorganismos, enzimas e nutrientes são acentuadas pelas suas associações iônicas (TATE, 1995).

Dentro do contexto nacional da agroindústria, a indústria sucro-alcooleira tem uma participação recente bem expressiva. Segundo o Instituto do Alcool e Açúcar (IAA) o investimento total no Programa Nacional do Pro-Álcool, incluindo recursos

privados e financiados nas áreas rural e industrial foi de US\$ 10,5 bilhões até 1990. Em comparação, mais de US\$ 18,3 bilhões foram poupados através da substituição da gasolina pelo álcool.

O cultivo da cana-de-açúcar se enquadra dentro do que se caracteriza uma monocultura (utilização de terra para o uso de somente uma cultura). O uso desta prática acarreta diferentes problemas, como anteriormente indicado. O empobrecimento rápido do solo e o aparecimento constante de pragas são os mais comuns. Os dois conduzem ao uso intensivo de fertilizantes e agrotóxicos que alteram os processos biológicos, químicos e físicos do solo e posteriormente provocam também a contaminação de lençóis-freáticos e corpos d'água superficiais. Além disso, no Brasil, o sistema de colheita mais freqüente é o que adota a prática da queima, já comentado, porém é mais agressiva ao ambiente apesar da facilidade para a colheita de cana-de-açúcar pelos empregados. A colheita mecanizada, que seria uma alternativa mais adequada para o ambiente, necessita de altos investimentos e de um acordo entre empresários, trabalhadores e governo, para poder ser implementada com expressividade (KIRCHHOFF, 1991).

Utilizando a técnica do  $^{13}\text{C}$ , CERRI *et al.* (1992) acompanharam ganhos e perdas de matéria orgânica e também estabeleceram a sua origem em solo desmatado cultivado com cana-de-açúcar. A Figura 1 mostra as curvas de variação do estoque de carbono orgânico total do solo de uma área desmatada e posteriormente cultivada com cana-de-açúcar e de uma área adjacente com o remanescente da mata natural, em função do tempo. A cobertura natural do solo pelo húmus da mata tem uma função nutricional na medida que serve como reservatório de lenta liberação de nitrogênio, fósforo e enxofre para o crescimento das plantas e microorganismos do solo. O mesmo não ocorre com a palhada da cana devido, principalmente, à destruição da palhada pela prática da queima antes da colheita. Quando o equilíbrio de um ecossistema natural é rompido e o solo utilizado para fins agrícolas, nota-se que, apesar da incorporação dos restos da cultura, o solo se torna cada vez mais pobre em carbono (CERRI *et al.*, 1992).



Fonte: CERRI *et al.* (1992).

**Figura 1.** Curvas de variação do estoque de carbono orgânico total, de solo de uma área desmatada e posteriormente cultivada com cana-de-açúcar e, de solo de uma área adjacente à mesma cultura com remanescente da mata natural, em função do tempo de cultivo.

Os impactos da queima da cana-de-açúcar no solo são muitos e podem ser melhor entendidos através da existência de interação solo - fogo, descrita a seguir. O fogo pode ser considerado de ocorrência natural, mesmo não sendo freqüente, exercendo uma significativa influência sobre a estrutura e o funcionamento de diversos tipos de ecossistemas terrestres, sendo capaz de delimitar caminhos evolutivos muito diferentes daqueles que ocorreriam na sua ausência. O fogo causa uma elevação da temperatura do solo no local em que ele ocorre sendo que a quantidade de energia térmica liberada depende da massa de material combustível, do vento, do grau de umidade, da biomassa vegetal etc. O fogo ainda causa a remoção da serapilheira (camada de detritos vegetais que se acumulam ao longo do tempo sobre o solo) e expõe o solo mineral diretamente ao impacto das gotas da chuva, causando modificações de estrutura e porosidade nas camadas superficiais (NEARY *et al.*, 1999).

Com a oxidação no solo de compostos orgânicos pela combustão, ocorre uma perda maior de ânions do que de cátions (como cálcio, magnésio e potássio). As cinzas são geralmente ricas em óxidos solúveis de bases, que se transformam em carbonatos capazes de neutralizar a acidez do solo. A alcalinização do ambiente

melhora as condições para a atividade de microorganismos assimiladores de nitrogênio (fixadores de nitrogênio), tais como *Clostridium ssp.* (bactéria anaeróbia) e *Azotobacter ssp.* (bactéria aeróbia), os quais, apenas nos primeiros 8 a 10 cm da superfície, são capazes de assimilar de 15 a 30 kg de nitrogênio por hectare (OLIVEIRA, 1994). Ainda, segundo MADIGAN (1997) o mais vigoroso fixador de nitrogênio é o *Clostridium pasteurianum*, que provavelmente é o responsável pela maior parte da fixação anaeróbia de nitrogênio no solo.

A biomassa microbiana do solo age como uma retentora de nutrientes, transportando estes das camadas mais superficiais até camadas não superficiais. Na maioria dos solos aráveis a biomassa microbiana que retém carbono e nitrogênio, respectivamente, é representada por aproximadamente 1 a 3% do carbono orgânico total do solo, e 2 a 6% do nitrogênio total no solo. O fogo induz o decréscimo da biomassa microbiana que retém carbono e nitrogênio no solo. As concentrações de carbono e nitrogênio pelas comunidades microbianas somente retornam aos teores normais depois de um período próximo a dez anos (FRITZE *et al.*, 1993).

A queima conduz também a uma redução da biomassa de fungos no horizonte orgânico do solo (camada superficial), provocando uma mudança significativa na composição de espécies da microbiota. Em contraste, a composição de espécies de fungos no solo mineral (camadas mais profundas) não é alterada pela queima do solo (BISSET & PARKINSON, 1980).

Quando a vegetação queima, parte de seu estoque de nutrientes minerais é perdida para a atmosfera na forma de gases (nitrogênio, enxofre) ou partículas extremamente pequenas (cálcio, potássio, fósforo). O restante dos nutrientes fica depositado na superfície do solo como cinzas, daí a razão do fogo promover uma adubação em curto prazo, prática muito comum na abertura de regiões de pastagens na Floresta Amazônica. Evidentemente a ação do fogo, em longo prazo, é diminuir o estoque mineral do solo. Parte dos nutrientes perdidos para a atmosfera retornam ao solo pela ação da gravidade ou em solução com a água da chuva (COUTINHO, 1982). Em vegetação de cerrado, dados obtidos pelo mesmo autor em Pirassununga-SP, mostram que a temperatura do solo sobe durante o período de combustão, atingindo um nível máximo de 74° C na superfície do solo.

Em trabalho realizado por ARAÚJO *et al.* (1995), com latossolo vermelho-amarelo com predomínio de pastagem, a resposta da elevação da temperatura em decorrência da queima (12 Kg de substrato / m<sup>2</sup>) está apresentada na Tabela 1. Pelos resultados, verifica-se que o calor atingiu a profundidade de 6 cm, tendo alcançado na superfície do solo 59°C em 18 minutos. Neste mesmo trabalho, constatou-se também que a atividade microbiana foi maior em solos submetidos à queima, onde a água de percolação umedeceu o solo, do que em solos não queimados. Fato que pode ser explicado com base no maior teor de carbono na camada superficial, nas melhores condições nutricionais proporcionadas pelas cinzas, assim como na umidade disponível aos microorganismos. Em camadas mais profundas do solo, a atividade microbiana é menor devido à menor disponibilidade de carbono.

**Tabela 1.** Temperatura do solo queimado (°C) com 12 Kg / m<sup>2</sup> de massa de substrato, nas profundidades de 0, 3, 6, 9 e 12 cm, dos 15 aos 48 minutos de queima.

| Tempo<br>(min) | Profundidades (cm) |    |    |    |    |
|----------------|--------------------|----|----|----|----|
|                | 0                  | 3  | 6  | 9  | 12 |
| (Sem queima)   | Temperatura (° C)  |    |    |    |    |
| 00             | 22                 | 21 | 20 | 23 | 20 |
| (Com queima)   |                    |    |    |    |    |
| 15             | 47                 | 20 | 20 | 21 | 19 |
| 18             | 59                 | 23 | 21 | 22 | 21 |
| 21             | 39                 | 25 | 20 | 21 | 20 |
| 24             | 33                 | 24 | 20 | 20 | 19 |
| 27             | 30                 | 24 | 20 | 19 | 19 |
| 30             | 29                 | 24 | 20 | 20 | 19 |
| 33             | 28                 | 24 | 21 | 20 | 19 |
| 36             | 28                 | 24 | 21 | 20 | 20 |
| 39             | 27                 | 24 | 21 | 20 | 19 |
| 42             | 26                 | 24 | 21 | 20 | 19 |
| 45             | 26                 | 23 | 22 | 21 | 20 |
| 48             | 25                 | 23 | 22 | 21 | 20 |

Fonte: ARAÚJO *et al.* (1995).

DIAS *et al.* (1996) determinaram a variação da temperatura em ambos solos de campos de Cerrado localizados no “Cristo Redentor” e no Jardim Botânico de Brasília, durante a passagem do fogo de uma queimada. Em profundidades abaixo de 2 cm o aumento da temperatura foi muito pequeno. O aumento observado a 1 cm de profundidade foi cerca de 5°C (de 25 a 30°C), e ocorreu 40 minutos após a passagem

da frente de fogo. NEVES *et al.* (1996) observaram alteração do regime térmico do solo de cerrado, cujos resultados estão apresentados na Tabela 2. Com os dados mostrados, nesta tabela, é possível perceber que o efeito do fogo só é significativo na superfície do solo. Abaixo de 5,0 cm todos os fatores analisados não sofreram modificações, o solo se mostrou um bom isolante térmico e as temperaturas nesta profundidade não ultrapassaram 50°C.

**Tabela 02.** Alteração do regime térmico do solo a diferentes profundidades após a primeira semana subsequente a queimada.

| Profundidade | Regime pré-fogo       |                       |        | Regime pós-fogo       |                       |        |
|--------------|-----------------------|-----------------------|--------|-----------------------|-----------------------|--------|
|              | T <sub>máx</sub> (°C) | T <sub>min</sub> (°C) | A (°C) | T <sub>máx</sub> (°C) | T <sub>min</sub> (°C) | A (°C) |
| 1 cm         | 28,0(0,2)             | 14,5 (2,7)            | 13,6   | 39,4 (5,2)            | 13,2 (0,9)            | 26,2   |
| 5 cm         | *                     | *                     | *      | 26,2 (1,6)            | 16,4 (0,5)            | 9,8    |
| 10 cm        | 20,6(0,1)             | 16,1 (0,3)            | 4,5    | 22,7 (0,6)            | 18,6 (0,4)            | 4,1    |

T<sub>máx</sub>: temperatura máxima; T<sub>min</sub>: temperatura mínima; A: amplitude. Os valores entre parênteses correspondem ao desvio padrão. \* Não determinados.

Fonte: NEVES *et al.* (1996).

Em outro trabalho, NEARY *et al.* (1999), observaram a severidade do fogo, como mostrado na Tabela 3, nas diferentes camadas de solo de chaparral (vegetação típica do sudoeste dos Estados Unidos da América e norte do México).

A faixa de temperatura de crescimento ótimo é uma das formas de agrupamento dos tipos microbianos existentes. Em geral, divide-se em (MADIGAN, 1997):

- Mesófilos, microrganismos que crescem em temperaturas ótimas entre 25 e 40°C;
- Psicrófilos, microrganismos que crescem em temperaturas inferiores a 20°C;
- Termófilos, microrganismos que crescem em temperaturas ótimas entre 40 e 65°C;
- Termófilos facultativos, microrganismos que se desenvolvem bem em uma ampla faixa de temperatura, variando desde 28°C até 56°C.

**Tabela 3.** Comparação das classes de severidade de fogo por temperatura, matéria orgânica (MO), microorganismos, e raízes em solo de chaparral.

| Parâmetro                               | Severidade do fogo         |                            |                            |
|---|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|   | Baixo                      | Moderado                   | Alto                       |
| Temperatura na superfície               | 250°C                      | 400°C                      | 675°C                      |
| Temperatura-25 mm                       | 100°C                      | 175°C                      | 190°C                      |
| Temperatura-50 mm                       | <50°C                      | 50°C                       | 75°C                       |
| Liter da superfície, MO <sup>a</sup>    | Parcialmente queimada      | Muito consumido            | Totalmente consumido       |
| MO do solo-25 mm                        | Início da destilação da MO | Parcialmente queimado      | Consumido/queimado         |
| MO do solo-50 mm                        | Não afetado                | Início da destilação da MO | Início da destilação da MO |
| Raízes de superfície                    | Morto                      | Morto                      | Morto                      |
| Raízes-25 mm                            | Morto                      | Morto                      | Morto                      |
| Raízes-50 mm                            | Vivo                       | Vivo                       | Morto                      |
| Microorganismos de superfície           | Morto                      | Morto                      | Morto                      |
| Microorganismos-25 mm                   | Vivo                       | Morte seletiva             | Morto                      |
| Microorganismos-50 mm                   | Vivo                       | Morte seletiva             | Morte seletiva             |
| Nutrientes de superfície voláteis       | N                          | N, P orgânico              | N, K, P e S                |
| Nutrientes de superfície voláteis-25 mm | Nenhum                     | Nenhum                     | Nenhum                     |
| Nutrientes de superfície voláteis-50 mm | Nenhum                     | Nenhum                     | Nenhum                     |

<sup>a</sup>Matéria orgânica. Fonte: NEARY *et al.* (1999).

Dentre os principais microorganismos do solo, bactérias em geral, actinomicetos e fungos, a maioria pertence ao grupo dos organismos mesófilos (TSAI *et al.*, 1992).

Vale aqui ressaltar que o solo a ser estudado no presente trabalho é latossolo vermelho-amarelo, de uma região onde já houve predomínio de mata de cerrado. No momento, esta região apresenta predomínio de cultura de cana-de-açúcar. Esse vegetal apresenta maior quantidade de material comburente, palhada, e portanto, a queima da cana-de-açúcar libera mais energia do que a queima da mata do tipo cerrado ou mesmo da de chaparral, citados nos parágrafos acima.

A matéria orgânica do solo constitui um sistema dinâmico que está sujeito a mudanças contínuas durante o processo de formação e decomposição de seus constituintes. A natureza desses processos depende das condições de formação das

propriedades químicas, físicas e físico-químicas do solo, da atividade microbiana, da cobertura vegetal, do relevo, dos fatores climáticos e da atividade do homem. O fogo acelera a mineralização da matéria orgânica do solo, fazendo em poucos minutos um trabalho que normalmente duraria meses ou anos. Assim, a perda da matéria orgânica do solo é um dos efeitos mais importantes do fogo, com conseqüências físicas, químicas e biológicas diretas e indiretas (OLIVEIRA, 1994).

### 3.1.1. Impactos da queima da cana-de-açúcar sobre a atmosfera

A queima da vegetação de extensas áreas, caso da cultura da cana-de-açúcar no Brasil, principalmente no estado de São Paulo, contribui com o aumento da concentração dos gases CO, CO<sub>2</sub> e O<sub>3</sub> e de partículas (fuligem) na superfície terrestre. Logo, estudos na área bem como também um monitoramento adequado aos locais de cultivo, para estes parâmetros, são importantes para a manutenção equilibrada do meio. Alguns trabalhos na área são expostos a seguir.

Além das partículas e aerossóis, as queimadas emitem para a atmosfera uma grande quantidade de gases, dentre eles o dióxido de carbono, CO<sub>2</sub>, e o monóxido de carbono, CO, gás reativo e tóxico quando em concentrações elevadas. A emissão destes e de outros gases, sob a ação da radiação ultravioleta solar, pode produzir grandes quantidades de ozônio, O<sub>3</sub>, o qual, além de tóxico, contribui também ao efeito estufa (SHAFER *et al.* 1987). Ainda, elevadas concentrações de ozônio (O<sub>3</sub>) difundidas na atmosfera podem se tornar de elevada severidade à vida, pois este é um dos mais poderosos oxidantes do Planeta, podendo por em risco toda a vida na Terra ao nível de solo (LAURE, 1991). Outro problema associado a estes gases poluentes é o fator deslocamento das massas de ar, que os transportam para longe dos locais de produção, influenciando desta maneira regiões remotas.

As concentrações naturais de O<sub>3</sub> na superfície da terra são da ordem de 20 a 40 ppbv (partes por bilhão de volume), porém em lugares poluídos sua concentração pode ultrapassar os 80 ppbv, nível médio horário que, segundo a legislação brasileira em vigor não deve ser ultrapassado. Em ambientes naturais, a concentração de CO varia de 50 a 150 ppbv, enquanto que em regiões poluídas ela pode chegar a vários 1000 ppbv (KIRCHHOFF, 1991).

Estima-se que somente no Estado de São Paulo as queimadas da cana injetam na atmosfera cerca de 350.000 toneladas de carbono na forma de monóxido de carbono (MARINHO, 1991).

Quando se queima a cana, libera-se energia e carbono na forma de monóxido (CO) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) em grandes concentrações na atmosfera. Porém, em longo prazo, a queima da cana-de-açúcar proporciona um balanço energético quanto à liberação de carbono. Embora se queime a sua palha e seu bagaço, no ano seguinte o carbono liberado para a atmosfera é novamente fixado pelas plantas em desenvolvimento. A incidência de CO<sub>2</sub>, no momento da queima no campo, é sessenta vezes menor do que o CO<sub>2</sub> retirado da atmosfera durante o crescimento da biomassa da cana (NICKELL, 1970). Aparentemente este fato parece solucionar o problema da emissão de carbono liberado na queima, porém não se pode esquecer da escala temporal da queima e da escala de refixação do carbono, enquanto um ocorre em poucas horas o outro leva um ano para ocorrer.

### **3.1.2. Impactos da água residuária gerada na indústria sucro-alcooleira: a questão da disposição da vinhaça no solo**

Com a implantação e consolidação do Pro-álcool no país, foram fixadas metas a serem atingidas em termos de produção de álcool. Segundo ORLANDO FILHO *et al.* (1995), o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar com 12 bilhões de litros de álcool, basicamente para fins carburantes. Atualmente cada litro de álcool produz 12 litros de vinhaça e, portanto, a quantidade de vinhaça produzida é da ordem de 144 bilhões de litros/ano. Devido ao alto poder poluente da mesma (devido a sua constituição química) e ao alto poder de fertilizante “natural”, surge a necessidade de seu aproveitamento, tanto econômico como ambiental. Porém, a utilização da vinhaça sem critérios técnicos mais elaborados, pode comprometer os solos agrícolas pela salinização em função dos elevados teores de sódio e potássio, além da poluição dos cursos d'água superficiais e dos aquíferos subterrâneos.

AGUJARO (1979) comparou a produtividade de cana irrigada e não irrigada com vinhaça, em três cortes de canas (safra 1972/73 e 1974) na Usina Tamoio - Estado de São Paulo, região próxima à área estudada, cerca de 2 a 3 km de distância.

A média dos cortes da área irrigada era de 100 t/ha, enquanto que a da área não irrigada ficou em torno de 80 t/ha. Vale lembrar que na área irrigada havia predominância de latossolo vermelho-amarelo fase arenosa (de menor fertilidade) enquanto nas áreas não irrigadas predominava o latossolo-roxo de fertilidade média a elevada.

SZMRECSÁNYI (1994) atribuiu como composição média da vinhaça os seguintes valores: 93,2 % de água e 6,8 % de sólidos em suspensão, sendo que 5,1 % deste último são constituídos de matéria orgânica e 1,7 % de substâncias minerais.

Estudos feitos por ORLANDO FILHO *et al.* (1980), sobre a composição da vinhaça, mostraram que a mesma é muito rica em matéria orgânica e nutrientes minerais como o potássio, cálcio e magnésio. A Tabela 4 apresenta as características físico-químicas da vinhaça segundo estes dois autores.

**Tabela 4.** Características físico-químicas da vinhaça.

| Parâmetros                                 | Valores         |
|--|-----------------|
| Produção volume (L/t. cana)                | 180 a 1.000     |
| DBO <sub>5,20</sub> (mg/L)                 | 20.000 a 35.000 |
| Temperatura (° C)                          | 80 – 90         |
| Sólidos Totais (g/L)                       | 21,80           |
| Sólidos Suspensos (g/L)                    | 5,01            |
| Sólidos Fixos (g/L)                        | 4,34            |
| Sólidos Dissolvidos (g/L)                  | 0,67            |
| Sólidos Fixos (g/L)                        | 16,09           |
| Sólidos Voláteis (g/L)                     | 12,24           |
| Massa específica (mg/L)                    | 1.007,4         |
| Viscosidade dinâmica (m <sup>2</sup> /s)   | 0,0009977       |
| Viscosidade cinemática (m <sup>2</sup> /s) | 0,00000099      |
| Condutividade elétrica (µmhos/cm)          | 5.000 a 6.000   |
| N (mg/L)                                   | 0,42            |
| P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/L)       | 0,11            |
| K <sub>2</sub> O (mg/L)                    | 2,70            |
| CaO (mg/L)                                 | 1,20            |
| MgO (mg/L)                                 | 0,48            |
| SO <sub>4</sub> (mg/L)                     | 1,46            |
| Fe (mg/L)                                  | 62              |
| Cu (mg/L)                                  | 4               |
| Zn (mg/L)                                  | 3               |
| Mn (mg/L)                                  | 6               |
| pH   | 3,9             |

Fonte: Adaptado de ORLANDO FILHO *et al.* (1980) e SZMRECSÁNYI (1994).

Observando-se a Tabela 4 verifica-se que a DBO<sub>5,20</sub> (Demanda Bioquímica de Oxigênio, 5 dias a 20°C), o volume produzido de vinhaça, os teores de oxido de potássio e o teor de sólidos dissolvidos, de 20-35 g/L, 180-1000L/t.cana, 2,7 mg/L e 0,67 g/L, respectivamente, são elevados, demonstrando o potencial poluidor da vinhaça se lançados em corpos d'água receptores. Segundo a resolução CONAMA nº20 de 1986 corpos d'água da classe especial, 2 e 3, não devem apresentar DBO<sub>5,20</sub> maior do que 3, 5 e 10 mg/L, respectivamente. A disposição inadequada ou mesmo o uso inadequado da vinhaça na fertirrigação, podem levar à salinização do solo, contaminação de lençóis freáticos ou mesmo a contaminação de rios próximos à cultura de cana-de-açúcar (ORLANDO FILHO *et al.*, 1995).

São vários os efeitos da vinhaça com relação às propriedades físicas, químicas e microbiológicas dos solos. Devido ao aumento da carga de matéria orgânica GLÓRIA & ORLANDO FILHO (1984) enfatizaram alguns efeitos da fertilização no solo, sendo eles:

- Elevação do pH;
- Aumento da disponibilidade de alguns nutrientes;
- Aumento do poder de retenção de cátions;
- Aumento da capacidade de retenção de água;
- Diminuição da disponibilidade do nitrogênio;
- Aumento da população e atividade microbiana;
- Melhoria da estrutura física do solo.

### **3.2. Avaliação da microbiota do solo: a importância das técnicas moleculares**

Muitos tipos de componentes celulares têm sido analisados para a melhor caracterização de microorganismos. As longas fitas de RNAr (RNA ribossômico) oferecem uma quantidade de informações que são únicas, e que fazem delas uma das melhores fontes de descrição de espécies de microorganismos. A seqüência de nucleotídeos do RNAr tem um significado filogenético e pode ser analisada a partir de uma grande e crescente base de dados de seqüências de RNAr de microorganismos cultivados e não cultivados. O RNAr é uma molécula ancestral, funcionalmente constante, universalmente distribuída, e moderadamente bem

conservada por largas distâncias filogenéticas. Devido a grande quantidade de diferentes e possíveis seqüências das bases do RNAr, uma similaridade em duas seqüências sempre indica uma relação de filogenia (MADIGAN *et al.*, 1997).

As informações de uma seqüência de RNAr também fornecem uma abordagem sistemática para o desenvolvimento de sondas de oligonucleotídeos que podem ser hibridizados com ácidos nucleicos de microorganismos, e assim contribuir para o conhecimento da especificidade das seqüências de RNAr de comunidades naturais (WARD, 1992). A hibridização nada mais é do que o pareamento de fitas de RNA e DNA complementares que se dissociam e se reassociam para produzir um RNA-DNA híbrido, ou para produzir um DNA-DNA híbrido (KING & STANSFIELD, 1997).

A maioria dos microorganismos em ambientes naturais não pode ser facilmente detectado sob exames microscópicos clássicos, porque as células microbianas se aderem às partículas dos sedimentos e de solos, o que dificulta a visualização das mesmas. Técnicas empregando os corantes fluorescentes como o dapi ou laranja de acridina têm confirmado essa dificuldade. Medidas da atividade bacteriana têm sido realizadas, mas elas não permitem discriminar as espécies microbianas. Experimentos fisiológicos são também utilizados com grande sucesso para caracterizar espécies isoladas, entretanto, os procedimentos não são muito comuns para todos os microorganismos que foram isolados do solo, pois apenas uma pequena fração de bactérias que ocorrem naturalmente tem sido isolada e caracterizada. O enriquecimento de culturas não é uma técnica totalmente adequada para o estudo de diversidade microbiana, pois não garante a reprodução segura das condições naturais dos microorganismos (MUYZER *et al.*, 1996).

Os solos provavelmente representam um dos mais complexos e difíceis ambientes de estudo. Existem evidências que mostram a presença de milhares de espécies de microorganismos em uma única amostra de solo (AMANN *et al.*, 1995).

A possibilidade de aplicar técnicas moleculares modernas e confiáveis para o estudo da comunidade microbiana do solo pode resultar em respostas para análise de diferentes contextos da Ecologia Microbiana.

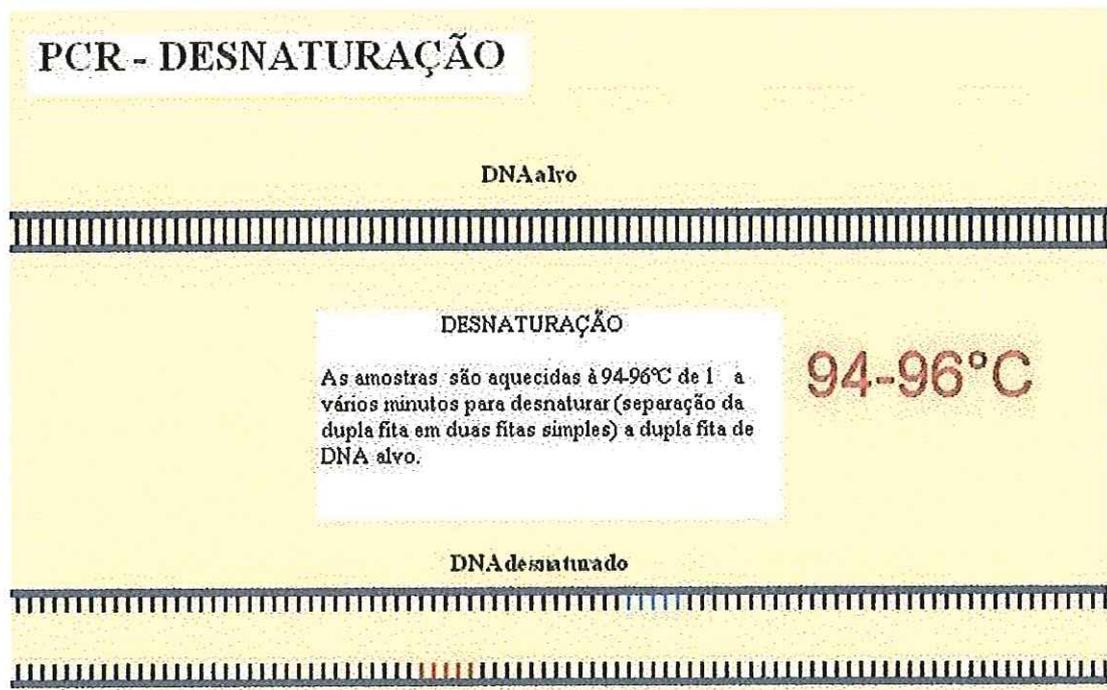
### 3.2.1 PCR (“Polymerase chain reaction” ou reação de polimerização em cadeia)

Avanços na Biologia Molecular têm complementado as técnicas da microbiologia clássica no estudo da Ecologia Microbiana. Abordagens filogenéticas moleculares, baseadas na clonagem e análise comparativa de genes RNAr 16S de comunidades microbianas naturais tem diminuído as limitações associadas com as técnicas tradicionais de culturas enriquecidas. Os genes RNAr isolados fornecem uma análise filogenética bem menos seletiva o que leva a uma visão mais ampla da estrutura da comunidade microbiana quando comparada com as técnicas tradicionais. Com *primers* de oligonucleotídeos específicos a reação de polimerização em cadeia (PCR) é usada para a recuperação de genes RNAr de comunidades naturais (REYSENBACH *et al.*, 1992).

A técnica que usa o PCR foi desenvolvida em meados da década de 80 e consiste na amplificação *in vitro* de um determinado segmento de DNA. O PCR consiste na amplificação exponencial do DNA (reação em cadeia), onde no final da amplificação a quantidade de DNA resultante será de  $2^n$  ( $n$  = número de ciclos efetuados). Inicialmente era utilizada a enzima Klenow (DNA polimerase de *E. coli*), uma molécula termosensível. Atualmente, utiliza-se a enzima Taq polimerase (DNA polimerase I), obtida de uma bactéria termoresistente (*Thermus aquaticus*).

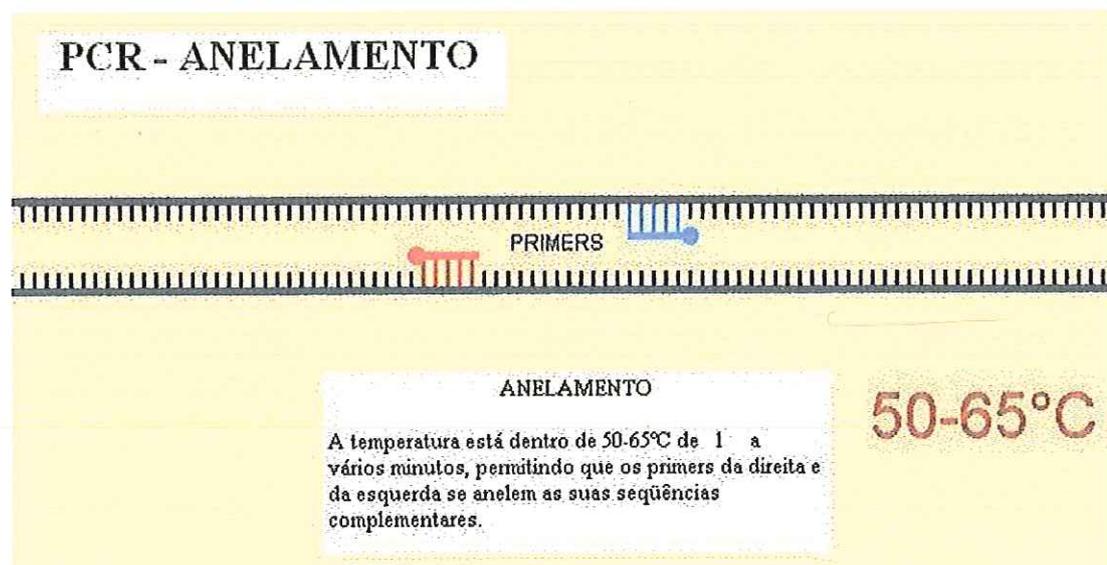
A técnica do PCR é composta por 25 a 40 ciclos, na qual cada ciclo é composto por três etapas; desnaturação, anelamento dos *primers* e extensão das novas fitas de DNA, como foi esquematizado nas Figuras de 2 a 6.

Na desnaturação, o DNA é aquecido a aproximadamente 95°C por alguns minutos até que ocorra a separação da dupla fita em duas fitas simples de DNA (Figura 2).



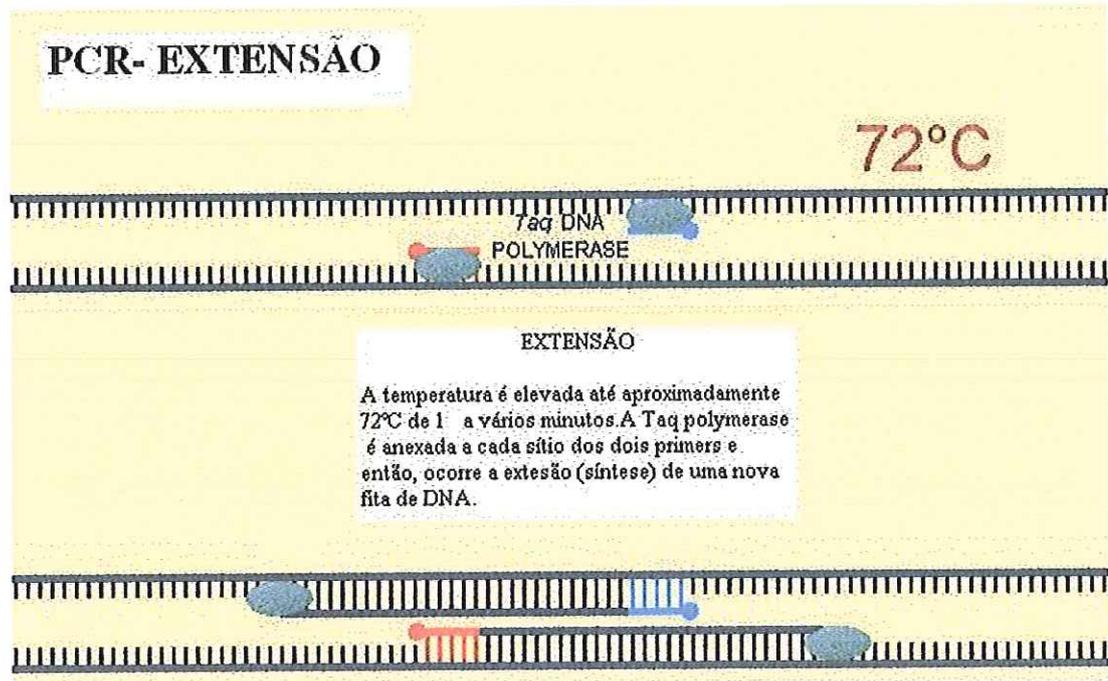
**Figura 2.** Etapas do PCR – Desnaturação da molécula de DNA.  
 Fonte: DNA Learning Center, Cold Spring Harbor Laboratory.

No anelamento as fitas simples de DNA são submetidas a uma redução de temperatura, dos 95°C da Desnaturação para um valor entre 50-65°C, por vários minutos a fim de que um par de *primers* (oligonucleotídeos usados como iniciadores na reação de polimerização em cadeia do DNA) se anele as suas seqüências complementares (Figura 3).



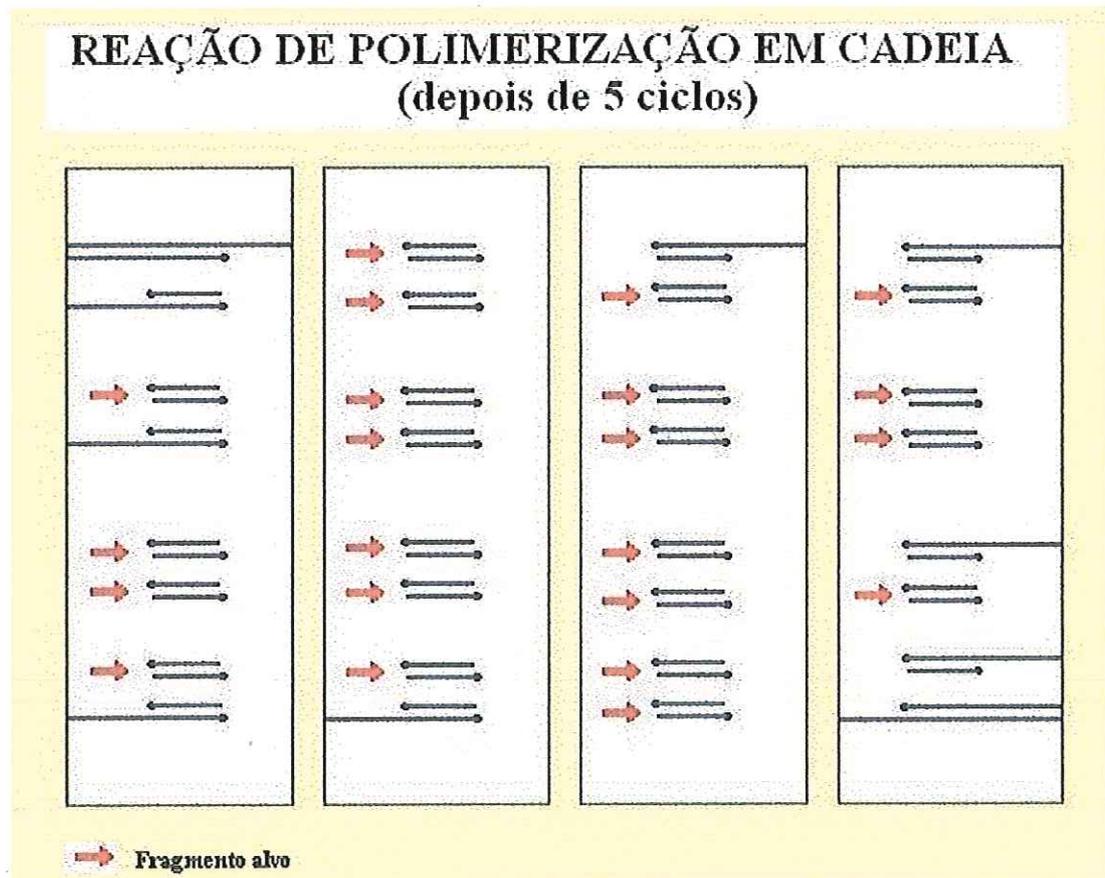
**Figura 3.** Etapas do PCR – Anelamento dos primers.  
 Fonte: DNA Learning Center, Cold Spring Harbor Laboratory.

Depois de anelados os *primers*, cada um em uma fita distinta de DNA, a temperatura é mais uma vez elevada até aproximadamente 72°C por vários minutos. A enzima *TaqDNA Polymerase* é adicionada ao conjunto de reação, se anexa ao sítio de reação de cada *primer* e então a síntese (extensão) de DNA começa (Figura 4).



**Figura 4.** Etapas do PCR – Extensão da nova fita de DNA.  
Fonte: DNA Learning Center, Cold Spring Harbor Laboratory.

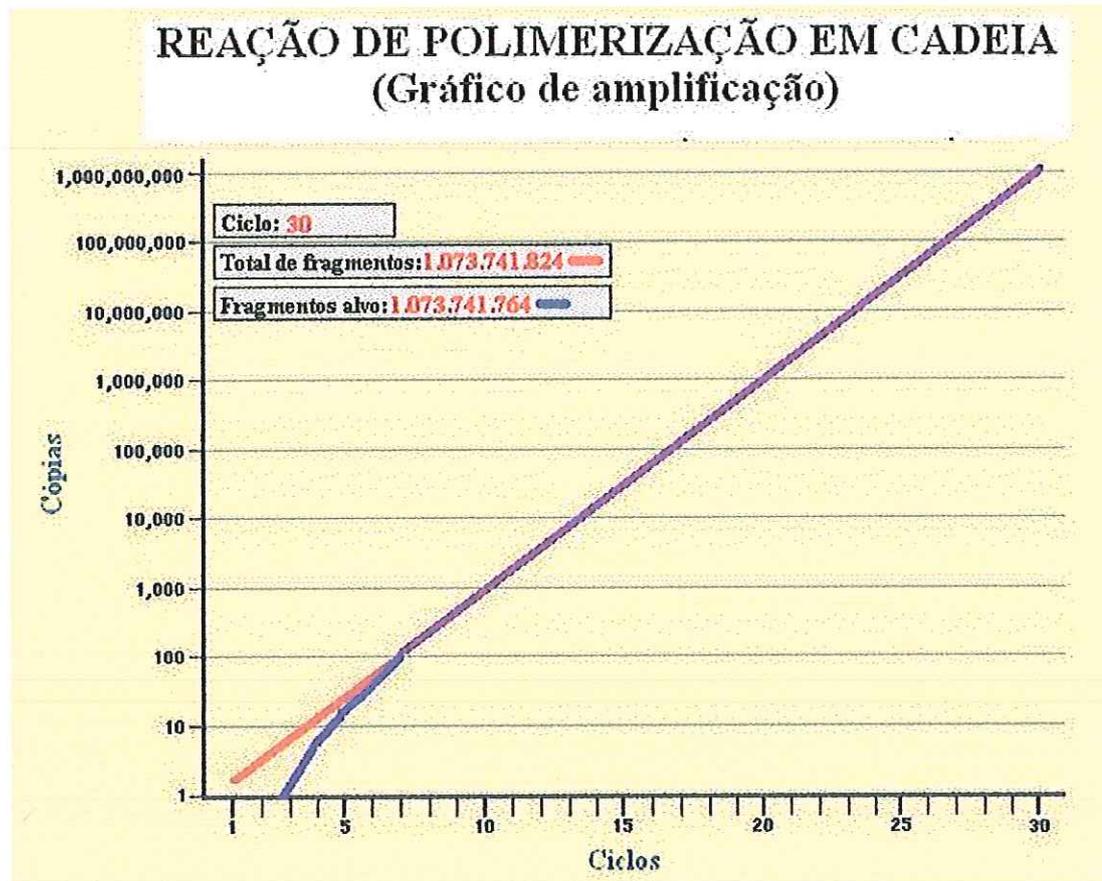
Na reação de polimerização em cadeia (PCR) estas três etapas ocorrem repetidas vezes até que um número suficiente de cópias do fragmento alvo da molécula de DNA seja produzido para posteriores manipulações (Figura 5).



**Figura 5.** Etapas do PCR: Moléculas de DNA resultantes 5 ciclos depois da reação de PCR.

Fonte: DNA Learning Center, Cold Spring Harbor Laboratory.

Também é possível através desta técnica a amplificação de fragmentos de RNA. Neste caso, o procedimento recebe o nome de PCR de transcrição reversa (RT-PCR) sendo que a enzima empregada é outra, uma DNA polimerase de transcrição reversa (RT-DNA polimerase). Depois de isolar ribossomos de bactérias do solo e destes extrair o RNAr, FELSKE *et al.* (1996), com o uso de *primers* para o RNAr 16S do Domínio Bacteria e de uma reação de polimerização em cadeia de transcrição reversa (RT-PCR), obtiveram um rendimento total de aproximadamente 0,2 µg de RNAr bacteriano por grama de solo.



**Figura 6.** Etapas do PCR: Rendimento da amplificação de DNA após 30 ciclos da reação de PCR.

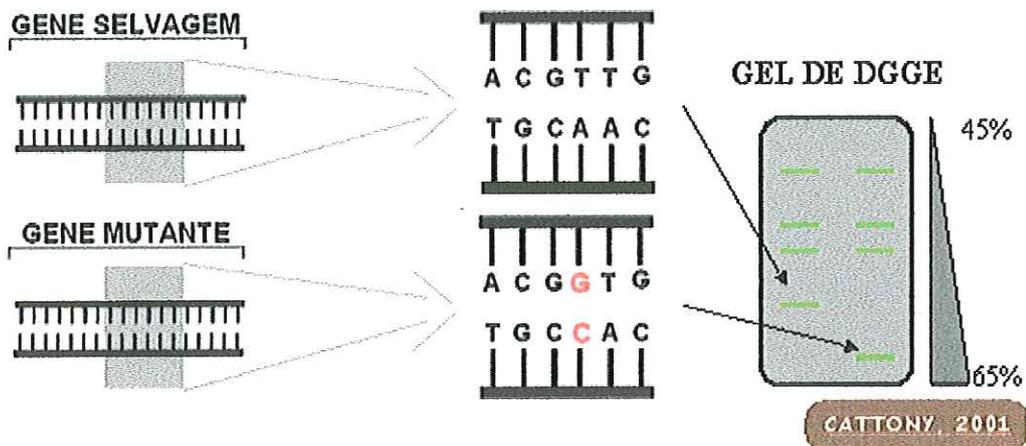
Fonte: DNA Learning Center, Cold Spring Harbor Laboratory.

Segundo SILVA & WITWER (2000), produtos de duas reações de PCR usando *primers* diferentes podem ser submetidos a uma eletroforese em gel de agarose e então separados. Esta separação ocorre devido ao diferente comprimento dos fragmentos produzidos nas duas reações. Entretanto, não há nenhuma informação a respeito da seqüência do produto amplificado. Existem várias técnicas que podem detectar alterações nos produtos de PCR, tais como: eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), eletroforese em gel de gradiente de temperatura (TGGE), cromatografia líquida de alta performance de desnaturação (DHPLC).

Dentre as aplicações do PCR podem ser citadas: - síntese enzimática de genes (clonagem de genes específicos em bactérias que tem por objetivo aumentar a escala de expressão do mesmo); - amplificação de fragmentos de DNA (estudos paleontológicos ou mesmo estudos na área criminalística); - diagnósticos (detecção de doenças); - elaboração de "fingerprinting" de DNA (análises de variabilidade genética).

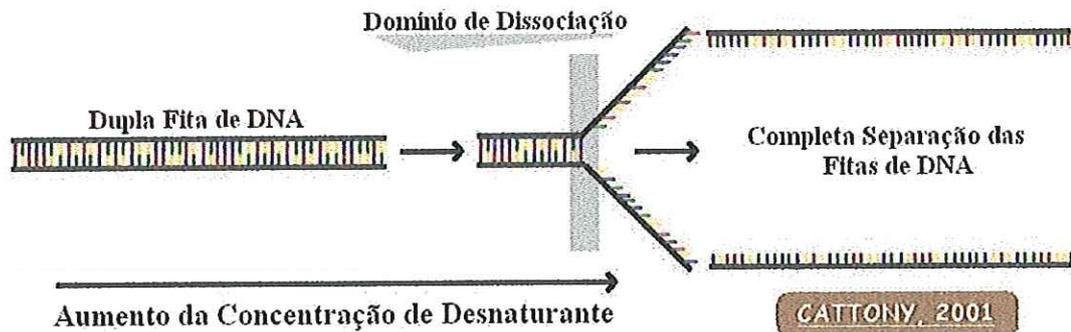
### 3.2.2 O DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* – Eletroforese em Gel de gradiente desnaturante)

Neste tipo de eletroforese, os fragmentos de DNA de mesmo comprimento, mas com diferentes seqüências de pares de bases podem ser separados, como é mostrado na Figura 7.



**Figura 7.** Diferentes seqüências de pares de bases podem ser separados pela técnica do DGGE. Na figura o gel de DGGE apresenta um gradiente de concentração desnaturante de 45-65%. As setas pretas indicam as diferentes mobilidades eletroforéticas entre dois fragmentos de DNA que diferem entre si em apenas um par de bases na sua constituição. A fidelidade do método é perdida quando fragmentos de DNA com mais de 500 pares de base são analisados.

A separação no DGGE é baseada na mobilidade eletroforética de um fragmento de DNA parcialmente dissociado em um gel de poliacrilamida contendo um gradiente desnaturante de DNA (uréia e formamida) que aumenta linearmente. A dissociação ocorre em um assim chamado “domínio de dissociação”, quando ocorre o alargamento dos pares de base devido ao aumento da concentração do desnaturante. Uma vez no domínio de dissociação com a concentração de dissociação mínima alcançada, ocorre a transição da forma helicoidal para forma de um fragmento parcialmente dissociado (como pode ser observado na Figura 8) e a migração então cessa.



**Figura 8.** Dissociação da molécula de DNA no gel desnaturante do DGGE.

Esse gradiente de concentração no domínio de dissociação está relacionado com uma posição particular no gel. A variação de seqüências leva a diferentes domínios de dissociação com diferentes gradientes de concentração. Logo, seqüências variantes de fragmentos particulares irão parar de migrar em diferentes posições no gel, sendo assim, separados (MUYZER *et al.*, 1993).

Usando a abordagem anterior, 50% das variações podem ser detectadas em fragmentos de DNA com até 500 pares de base. Esta porcentagem pode aumentar para perto de 100% por uma anexação de uma seqüência rica em "GC" no fragmento de DNA. Dentro dos estudos de variabilidade genética, a técnica do DGGE permite uma diferenciação entre as comunidades de uma amostra e também uma diferenciação entre indivíduos de uma mesma espécie (MUYZER *et al.*, 1993).

Dentre as desvantagens do DGGE estão (MANFIO *et al.*, 1999): o custo dos primers com GC-clamp, limite para análise de fragmentos de PCR com até 500 pb, genes excepcionalmente ricos em GC não são facilmente analisados por DGGE, o método envolve o uso da substância tóxica formamida e a coincidência nos domínios de dissociação de fragmentos variantes de DNA.

Dentre as vantagens do DGGE não citadas anteriormente estão: a metodologia é simples e consiste em um método de detecção não radioativo, e fragmentos de PCR podem ser isolados do gel e usados posteriormente em reações de seqüenciamento.

A amplificação de fragmentos de DNAr 16S de amostras ambientais, tais como de solos e sedimentos, através da reação de polimerização em cadeia (PCR), combinada com a separação destes mesmos fragmentos através de seus diferentes comportamentos de desnaturação, tornou-se uma ferramenta popular da Ecologia

Microbiana desde 1993 (MUYZER *et al.*, 1993). Entretanto, muitos trabalhos têm demonstrado que algumas combinações de *primers* utilizadas na reação de amplificação têm como produto final fragmentos de DNA em diferentes concentrações daquelas obtidas logo após a extração das amostras. Tais observações têm criado dúvidas a respeito da fidelidade deste método, PCR-DGGE, e uma comum relutância em afirmar que mudanças no padrão de bandas do DGGE refletem uma mudança da estrutura da comunidade bacteriana (BRÜGGEMANN *et al.*, 2000). Porém, ainda segundo BRÜGGEMANN *et al.* (2000), estas diferenças na concentração do produto final do PCR não são significantes a ponto de não se considerar os resultados obtidos pelo método. A escolha e a abordagem do método devem ser cuidadosamente estudadas para que a análise dos resultados não perca credibilidade.

TESKE *et al.* (1996) investigaram uma co-cultura de composição desconhecida pela técnica PCR-DGGE, que era capaz de conservar a redução de sulfato mesmo depois da exposição ao oxigênio. O DGGE separou duas bandas do produto do PCR, indicando duas diferentes bactérias como componentes da cultura. Os fragmentos foram então extraídos do gel e seqüenciados. As bandas foram identificadas como sendo derivadas de uma fita de *Desulfovibrio* e a outra de uma fita de *Arcobacter*.

Trabalhando com fragmentos de RNAr 16S, KOWALCHUK *et al.* (1997) analisaram a subdivisão- $\beta$  das comunidades de bactérias oxidadoras de amônia de amostras retiradas de dunas de areia costeiras. Duas bandas separadas pelo DGGE foram excisadas do gel e então seqüenciadas. As duas seqüências se mostraram intimamente ligadas às bactérias oxidadoras de amônia da subdivisão- $\beta$  e o conjunto dos *primers* usados ("CTO"), na reação de PCR, teve sua especificidade comprovada.

FERRIS *et al.* (1996) estudaram a comunidade bacteriana de uma piscina térmica do Parque Nacional de Yellowstone dos Estados Unidos. Cultivando, clonando e seqüenciando os fragmentos de RNAr 16S obtidos na fonte térmica, os autores encontraram e identificaram várias populações bacterianas. Entretanto, esta metodologia requer muito tempo. Logo, foi proposto um teste com a técnica DGGE, que é mais rápida, usando-se a mesma abordagem do estudo até então realizado. O

DGGE não foi capaz de diferenciar todas as populações anteriormente encontradas, porém, o método ofereceu uma rápida detecção das populações predominantes que tiveram seu DNA amplificado via PCR.

A vantagem da técnica PCR-DGGE sobre outras técnicas de “fingerprinting” é o surgimento ou o desaparecimento de bandas como consequência de uma perturbação ambiental. Deste modo, é possível haver o monitoramento “*in situ*” da estabilidade e atividade das comunidades bacterianas (ELSAS *et al.*, 1998).

### **3.2.3 Populações de actinomicetos como componentes da comunidade microbiana nos solos**

Os actinomicetos do solo foram escolhidos, no presente trabalho, como base de referência para as modificações na estrutura da comunidade bacteriana. Esta escolha não foi por acaso, os actinomicetos não apresentam populações dominantes no solo, porém desempenham um papel funcional vital dentro da comunidade microbiana. Os actinomicetos degradam substâncias normalmente não decompostas pelas populações de fungos e outras bactérias, como celulose, hemiceluloses, fenóis, quitina, queratina, ligninas e húmus. Além disso, os actinomicetos do gênero *Streptomyces*, são responsáveis pela produção de um grande número de substâncias farmacologicamente ativas e compostos diversos de aplicação industrial, incluindo mais de 4.000 antibióticos, agentes imunomoduladores, inibidores enzimáticos e enzimas (MANFIO, 2000).

Segundo PEREIRA *et al.* (1998), as bactérias da ordem Actinomycetales são denominadas genericamente por actinomicetos. Apresentam características específicas como procariontes, tais como ausência de membrana nuclear; sensibilidade às lisoenzimas e agentes antibacterianos; crescimento cúbico, formando grúmulos em meio de cultura líquida, filamentos finos semelhantes às hifas fúngicas com diâmetros entre 0,5 a 2,0 mm, tipicamente ramificados e denominados micélios; e reprodução por fragmentação das hifas ou por produção de esporos assexuados em áreas especializadas do micélio. Os actinomicetos são encontrados em muitos habitats. No solo, são numericamente menos dominantes do que outras populações bacterianas, porém são mais numerosos do que as populações fúngicas.

Normalmente, de 10 a 50% da comunidade microbiana do solo é constituída por populações destes microrganismos (PEREIRA *et al.* 1998).

Entre os actinomicetos, os gêneros que predominam na rizosfera (região do solo sobre influência das raízes) são *Nocardia* e *Streptomyces* (CARDOSO, 1992). O gênero *Streptomyces* representa aproximadamente 70 a 90% das colônias desenvolvidas em meio de cultura sólido, o gênero *Nocardia* usualmente é o segundo gênero mais abundante (5-30%), seguido pelo gênero *Micromonospora* que ocorre com freqüência entre 1 a 15% (PEREIRA *et al.* 1998).

Por degradarem substâncias como celulose, hemiceluloses, fenóis, quitina, queratina, ligninas e húmus, fica evidente que os actinomicetos apresentam complexos enzimáticos diferentes. De certa forma, isto poderia explicar a diversidade de nichos ecológicos presentes no solo (CERRI *et al.*, 1992). Ainda como reflexo destas diferenças metabólicas, a Tabela 5 mostra a composição química elementar de alguns organismos que vivem no solo.

**Tabela 5.** Análise elementar expressa em matéria seca.

| Material orgânico | Carbono (%) | Nitrogênio (%) | Fósforo (%) | Enxofre (%) | Potássio (%) |
|-------------------|-------------|----------------|-------------|-------------|--------------|
| Bactéria          | 50          | 15             | 3,2         | 1,1         | ...          |
| Actinomiceto      | 50          | 11             | 1,5         | 0,4         | 1,8          |
| Fungo             | 44          | 3,4            | 0,6         | 0,4         | 0,6          |
| Minhoca           | 46          | 10             | 0,9         | 0,8         | 1,1          |

Fonte: CERRI *et al.* (1992).

Os esporos são a forma predominante dos actinomicetos no solo. As hifas são mais sensíveis ao calor e à dessecação do que os esporos, que por sua vez, são menos resistentes que os endosporos bacterianos. Os esporos possibilitam a sobrevivência em condições ambientais adversas, como períodos de seca ou deficiência nutricional. O alto teor de umidade é desfavorável ao crescimento destes microrganismos. Espécies do gênero *Streptomyces* são aeróbias, sendo raras em solos alagados. Entretanto, algumas espécies dos gêneros *Actinomyces* e *Agromyces* são microaeróbias, requerendo baixas tensões de oxigênio para o seu crescimento. A faixa ótima de pH para o seu desenvolvimento está entre 6,5 e 8,0, sendo pH 5,0

limitante para o crescimento da maioria das espécies de importância ecológica (PEREIRA *et al.* 1998). Em geral os actinomicetos são menos favorecidos do que as bactérias e os fungos, pois são organismos de crescimento lento e pouco competitivos, não conseguindo dominar em substratos orgânicos nos quais outros microorganismos se instalam mais rapidamente (CARDOSO, 1992).

A importância dos actinomicetos também tem sido relacionada com a produção de diversas substâncias de aplicação farmacológica e industrial, incluindo antibióticos, enzimas, inibidores enzimáticos e agentes imunomoduladores (PEREIRA *et al.* 1998).

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de solo foram tomadas de acordo com o manejo local. Assim, foram coletadas antes e imediatamente após a prática da queima da cana-de-açúcar, prática esta bastante comum para reduzir a quantidade de palha antes do corte manual da planta. Amostragens foram também realizadas depois de quatro meses da vegetação ter sofrido queima e corte, e deixada para nova floração. Além disso, amostras de uma pequena mata preservada por cerca de sessenta anos, situada próxima à região da plantação de cana-de-açúcar estudada, foram também analisadas. Foram feitas análises granulométricas e de fertilidade das amostras de solo. As análises da comunidade microbiana foram procedidas de acordo com as referências para a técnica DGGE, em cooperação com os pesquisadores da Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello de Campinas – SP.

As amostras de solo foram retiradas de dois locais pré-definidos de 1 m<sup>2</sup>, um dentro do canavial e o outro fora (área de influência). Os pontos de amostragem foram sempre dentro deste 1 m<sup>2</sup>, tanto no canavial quanto na mata. Com o uso de um anel de Kopeck, as amostras de diferentes profundidades do solo, foram retiradas. A amostragem ocorreu em três momentos, antes da queima do canavial, logo após a queima e 4 meses após a queima. Foram analisados dois tipos diferentes de variáveis, as bióticas e abióticas.

Dentro das variáveis abióticas foram analisados os seguintes parâmetros:

- Medida pluviométrica (com o uso de um pluviômetro);
- Temperatura mínima e máxima do solo nas profundidades 0; 3; e 6 cm (com o uso de termopares);
- Análises físico-químicas do solo;
- Definição do adubo empregado no local;
- Uso da vinhaça como adubo orgânico.

Dentro das variáveis bióticas foram analisados:

- Diversidade bacteriana no solo;
- População de Actinomicetos.

Um breve resumo esquemático das etapas deste trabalho é mostrado na Figura 9.

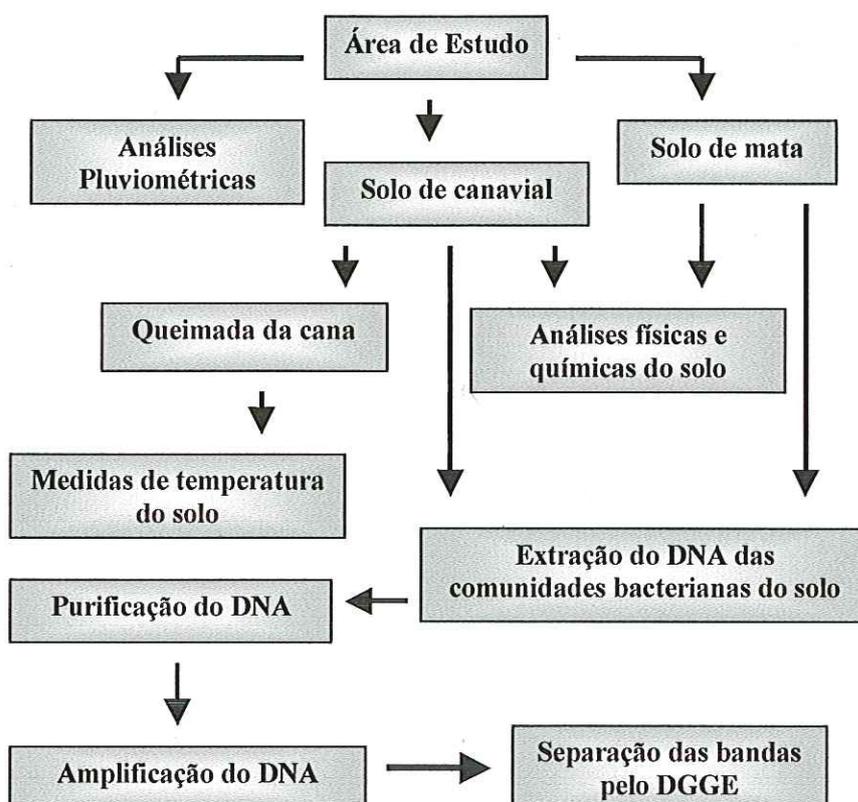


Figura 9. Etapas operacionais do trabalho.

#### 4.1 Área de Estudo

A área de estudo está situada entre São Carlos e Araraquara, região da Usina Tamoio, Sítio Paraíso. Foram tomadas seis amostras, duas no canavial antes da queima, duas em uma área próxima ao canavial, floresta mantida intocada por cerca de 60 anos (área de influência), e duas no mesmo local do canavial depois da queima. As análises experimentais foram realizadas no Laboratório de Processos Biológicos do Departamento de Hidráulica e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos - USP.

## 4.2 Coleta das amostras de solo

As amostras de solo foram retiradas utilizando-se o anel de Kopeck (figura 10), método do anel volumétrico. O método consiste no uso de um anel de aço de bordos cortantes e capacidade interna conhecida, aproximadamente 50 cm<sup>3</sup>. O aparelho consta de uma haste que tem em uma extremidade um cabo e em outra um cilindro guia, o qual abriga internamente o anel. Pela haste corre uma massa de ferro que pode ser movimentada entre o cabo e o cilindro guia, martelando e introduzindo-o no solo, juntamente com o anel.



**Figura 10.** O anel de Kopeck está sobre o macaco hidráulico e a massa de ferro, presa a haste, está encostada na árvore.

Utilizando-se um macaco hidráulico as amostras de solo de uma profundidade específica foram retiradas do cilindro e finalmente guardadas em tubos de polipropileno de 15,0 ml. As amostras foram imediatamente colocadas no gelo e logo em seguida encaminhadas para o laboratório, onde foram congeladas a -20°C. Parte dessas amostras foi encaminhada para a EMBRAPA (São Carlos), onde foram analisadas quanto à granulometria, macro e micronutrientes.

As amostras foram sempre retiradas do mesmo metro quadrado;

- Em uma mata (área de influência) nas profundidades de 0; 3 e 6 cm;
- No canavial antes da queima nas profundidades de 0; 3 e 6 cm de profundidade;
- No canavial depois da queima nas profundidades de 0; 3 e 6 cm de profundidade;
- No canavial quatro meses depois da queima nas profundidades de 0; 3 e 6 cm de profundidade;

#### 4.3 Medidas de temperatura no solo

A influência da temperatura do solo foi o enfoque deste trabalho. A variação abrupta da temperatura causada pela queima da cana, na superfície do solo e nos primeiros centímetros abaixo dela podem influenciar a estrutura das populações dos microorganismos que fazem parte da comunidade que habita o solo em questão. Portanto, foi de crucial importância que a temperatura do solo fosse avaliada nas profundidades de interesse.

Sob a orientação do Prof. Woodrow Nelson Lopes Roma (Departamento de Hidráulica e Saneamento – EESC/USP), as medidas de temperatura foram tomadas através de termopares (Cromel/Alumel - NiCr-Ni) ligados a um voltímetro HP por intermédio de um coletor de pontos. Foram ao todo 5 termopares: 4 de 25 metros e um de 75 metros. Os termopares foram enrolados com o auxílio de uma furadeira e principalmente pela presença de três pessoas que mantiveram o fio esticado durante este processo. Uma vala de 30 cm de profundidade foi cavada ao longo de 100 metros (distância do galpão onde se encontrava o voltímetro e as pontas dos termopares) para a proteção dos termopares que foram enterrados na mesma. A 75 metros do galpão foi colocada uma placa de alumínio que também foi enterrada. Nesta placa foram parafusados 4 sindais aos quais foram também presos os 4 termopares de 25 metros. O termopar de 75 metros foi usado simplesmente para monitorar a temperatura da placa e permaneceu ligado diretamente ao voltímetro. Os outros 4 foram ligados ao voltímetro através de um cabo de rede de computador que também estava conectado à placa. As 4 pontas dos termopares menores foram então enterradas, cada uma em uma profundidade diferente: 0; 3; 6 e 10 cm de profundidade respectivamente. A temperatura do galpão também foi monitorada durante todo o processo de leitura.

#### 4.4 Análises físico-químicas do solo

As análises físicas e de fertilidade do solo, bem como algumas químicas foram feitas no Laboratório de Solos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) – Centro de Pesquisa de Pecuária do Sudeste (CPPSE). Estas análises foram realizadas dentro das normas do Programa de Controle de Qualidade 2000 (Análise de Solo – Sistema IAC).

#### 4.5 Índice pluviométrico

A umidade do solo está intimamente ligada ao regime pluviométrico, portanto foram feitas medidas pluviométricas diárias, no local onde foram retiradas as amostras de solo, no período entre a primeira amostragem, antes da queima e a última amostragem, 4 meses depois da queima.

Estas medidas foram tomadas seguindo-se o seguinte procedimento:

- O pluviômetro foi instalado em uma estaca a uma altura do solo de um metro e meio e com a boca cinco centímetros acima da estaca de fixação;
- O pluviômetro foi instalado a uma distância de quinze metros de outros obstáculos (árvores, casas, construções, etc.);
- O pluviômetro foi fixado a um poste com dois parafusos adequados, de maneira a permitir sua retirada facilmente;
- A leitura e anotação da quantidade de água marcada foram feitas todos os dias às nove horas da manhã;
- Durante todo o período o volume pluviométrico foi marcado a cada dia em um mapa;
- Após cada anotação no mapa, o pluviômetro foi retirado do suporte, a água em seu interior despejada e ele recolocado em seu lugar;

No final do período o mapa foi usado para melhor interpretar a interferência do fator intempéries sobre as comunidades bacterianas do solo.

Outro fator associado ao regime de chuvas utilizado neste trabalho foi a ocorrência de veranicos. Toda a zona intertropical é afetada por períodos de interrupção da precipitação que ocorre durante a estação chuvosa. Este fenômeno, denominado regionalmente de “veranico”, foi identificado por vários autores, entre eles COCHRANE *et al.* (1982) *apud* ASSAD *et al.* (1993).

Os parâmetros, para veranicos, utilizados neste trabalho foram:

- Dias secos (com menos de 1mm de precipitação) (ds);
- Períodos contínuos sem precipitação (soma dos dias consecutivos com menos de 1mm de precipitação) (pc).

A água precipitada em valores inferiores a 1 mm/dia é dificilmente absorvida pelo solo, sendo rapidamente evaporada mantendo, assim, o efeito do veranico (ASSAD, 1993).

#### 4.6 Organismos indicadores

Como normalmente 10 a 50% da comunidade microbiana do solo é constituída por populações de actinomicetos, estes microorganismos foram utilizados como indicadores, utilizando duas abordagens de estudo:

- 1º. Análise da comunidade de actinomicetos do solo;
- 2º. Análise de toda comunidade bacteriana do solo.

Foram utilizados seis microorganismos como padrões, dois negativos e quatro positivos (actinomicetos), para as análises de toda estrutura da comunidade bacteriana (Tabela 6). Todas as culturas foram adquiridas da Coleção de Culturas Tropical na Fundação André Tosello em Campinas-SP. Dentre estes microorganismos escolhidos, a *Escherichia coli*, que não é encontrada no solo, foi

usada para geração de um controle quanto à separação das bandas no gel de DGGE e juntamente com o *Lactobacillus plantarum*, ainda foi usada como controle negativo para o produto das amplificações de amostras de DNA com o uso de *primers* específicos para actinomicetos.

**Tabela 6.** Organismos investigados neste estudo.

| <b>Espécie</b>                              | <b>Abreviação</b> |
|---|-------------------|
| <i>Clavibacter michigalensis</i>            | CM                |
| <i>Escherichia coli</i> <sup>#**</sup>      | EC                |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> <sup>#</sup> | LP                |
| <i>Micrococcus luteus</i>                   | ML                |
| <i>Streptomyces violaceoruber</i>           | SVL               |
| <i>Streptomyces viridochromogenes</i>       | SVR               |

<sup>#</sup> Não actinomiceto. <sup>\*\*</sup> Não é encontrada no solo.

#### 4.7 Eletroforese em gel de agarose

Todas as amostras naturais de DNA obtidas, bem como os produtos de amplificação via PCR, foram submetidos a uma prova em gel de agarose. Os passos para a confecção do gel são descritos a seguir (FANTINATI *et al.*, 1999):

- Pesar a agarose para uma concentração de gel desejada (geralmente entre 0,8 e 1,2 %, dependendo do tamanho dos fragmentos a serem separados, tabela 7). O volume de gel a ser preparado deve levar em consideração o tamanho da bandeja. A altura do gel deve ser de aproximadamente de 4 mm, a fim de se evitar bandas disformes e difusas.
- Adicionar o volume de tampão TEB 1X (solução estoque 5X, 54 g de Trizma base, 27,5 g de ácido bórico, 20 ml de EDTA 0,5 M pH 8, acrescentar, o quanto faltar para 1000 ml, de água destilada) em um erlenmeyer ou frasco Schott. Dissolver a agarose através de aquecimento em forno de microondas (potência média), agitando a solução ocasionalmente até levantar fervura.
- Resfriar a solução até aproximadamente 60 °C. Adicionar brometo de etídeo (solução estoque a 10 mg/ml) diretamente ao gel, em concentração de 1 µl para cada 100 ml de gel, evitando assim a necessidade de corar o gel após a corrida. **Cuidado**, o brometo de etídeo é mutagênico e deve ser manuseado (inclusive o gel) com luvas.

- Verter a agarose na cuba evitando bolhas. Esperar solidificar antes de transferir para a cuba de eletroforese contendo tampão TEB 1X (o suficiente para cobrir o gel com um filme fino de tampão).
- As amostras de DNA devem ser misturadas em tampão de amostra (glicerol 50 %, Azul de bromofenol 0,25 %, dissolvidos em TE) na proporção de 5:2 (v/v), respectivamente, antes de serem aplicadas nas canaletas do gel. Usar um pedaço de Parafilm para realizar as misturas.
- Aplicar uma corrente elétrica de voltagem constante de no máximo 5 V/cm de gel (a distância total entre os dois eletrodos deve ser considerada). Voltagens maiores esquentam o gel e podem causar distorções na migração. Geralmente, monitora-se a corrida eletroforética até que o indicador de tampão de amostra (azul de bromofenol) chegue ao final do gel.

**Tabela 7.** Concentração de agarose e resolução de fragmentos de DNA.

| Concentração de agarose<br>(%, w/v) | Tamanho de fragmentos<br>(kb) |
|-------------------------------------|-------------------------------|
| 0,3                                 | 1,0 – 70,0                    |
| 0,5                                 | 0,7 – 45,0                    |
| 0,8                                 | 0,4 – 20,0                    |
| 1,0                                 | 0,3 – 10,0                    |
| 1,2                                 | 0,2 – 6,0                     |
| 1,5                                 | 0,2 – 6,0                     |
| 2,0                                 | 0,1 – 5,0                     |

Fonte: FANTINATI *et al.*, 1999.

#### 4.8 Extração de DNA do solo

Os métodos de extração de DNA de solos e sedimentos têm sido modificados constantemente para atender os seguintes itens de interesse: composição do sedimento, eficiência de recuperação do DNA, integridade do DNA recuperado e pureza do DNA recuperado (ALM & STAHL, 1996). No presente trabalho foi utilizado o protocolo de TSAI & OLSON (1991), que segue adiante:

- Misturar 1,0 grama de solo ou sedimento com 2,0 ml de Fosfato de Sódio 0,12 M (pH 8,0) em tubo de centrífuga de 15,0 ml. Agitar a 120-150 RPM por 15 minutos.
- Centrifugar o lodo formado a 6.000 Xg por 10 minutos. Remover o sobrenadante e descartar. Lavar o “pellet” com 2,0 ml de Fosfato de Sódio 0,12M e agitar brevemente. Centrifugar a 6.000 Xg por 10 minutos, remova e descarte o sobrenadante.
- Suspende o “pellet” em 2,0 ml de solução de Lise (NaCl 0,15 M, NaEDTA 0,1 M [pH 8,0]) contendo 15,0 mg de lisozima/ml. Incubar em banho-maria a 37°C por 3 horas agitando a cada intervalo de 20-30 minutos. Colocar no gelo ao final do banho.
- Adicionar 2,0 ml de solução Tampão Lise (NaCl 0,1 M – Tris HCl 0,5 M [pH 8,0] – 10% de Dodecil Sulfato de Sódio) e homogeneizar bem.
- Submeter a amostra a três ciclos de congelamento à -70,0°C (+/- 5 a 10 minutos) e de descongelamento em banho-maria a 65,0°C (por 10 minutos) intercalados. Colocar no gelo ao final dos três ciclos.
- Após os ciclos de congelamento e descongelamento, adicionar 2,0 ml de Fenol saturado com Tris HCl 0,1 M (pH 8,0) e misturar brevemente no “vortex” para se obter uma emulsão.
- Centrifugar a mistura a 6.000 Xg por 10 minutos.
- Coletar aproximadamente 3,0 ml do sobrenadante em novo tubo de 15,0 ml e adicionar 1,5 ml de Fenol e 1,5 de Clorofórmio – Álcool Isoamílico (24:1). Agitar brevemente e centrifugar a 6.000 Xg por 10 minutos.
- Transferir 2,5 ml do sobrenadante para novo tubo de 15,0 ml.
- Adicionar 2,5 ml de Clorofórmio – Alc. Isoamílico (24:1). Agitar e centrifugar a 6.000 Xg por 10 minutos.
- Transferir 2,0 ml da camada superior do sobrenadante para um novo tubo de 15,0 ml.
- Finalmente precipitar o DNA extraído na fase aquosa (aproximadamente 2,0 ml) com 2,0 ml de Isopropanol gelado (-20,0°C), inverter cuidadosamente várias vezes e incube a -20,0°C por 1 hora ou “overnight”.



- Coletar uma alíquota da solução de DNA em microtubo, colocando 1,0 ml em cada.
- O precipitado de DNA é obtido por centrifugação da solução a 10.000 Xg a 4,0°C por 10 minutos.
- Lavar o “pellet” em 0,5 ml de Etanol 75%.
- Centrifugar a solução a 10.000 Xg por 10 minutos a 4,0°C. Remover e descartar o sobrenadante.
- Secar o “pellet” ao ar por 15 minutos.
- Suspender o “pellet” em 100 µl de solução Tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA) e cuidadosamente. Guardar o DNA em geladeira a 4,0°C.

#### 4.9 Purificação do DNA

A extração de DNA de solos sempre resultou na co-extração de substâncias húmicas que interferem na detecção do mesmo. Esta contaminação pode inibir a *Taq* DNA polymerase na reação de PCR, interferir na digestão por enzimas de restrição, e reduzir a eficiência da dissociação (fita dupla – fita simples de DNA) e especificidade da hibridização do DNA (ZHOU, 1996). A purificação do DNA é um passo crítico que segue a extração direta do DNA até a obtenção de suficiente DNA purificado.

- **Purificação - Passo I** (precipitação com Cloreto de Césio e Acetato de Potássio)
- ✓ Adicionar 0,1 g de CsCl a 100 µl de extrato bruto.
- ✓ Incubar por 1-3 horas à temperatura ambiente.
- ✓ Centrifugar por 20 minutos à velocidade máxima em microcentrífuga à temperatura ambiente.
- ✓ Recuperar o sobrenadante (~100 µl) em um tubo de microcentrífuga.
- ✓ Adicionar 400 µl de água Milli-Q e 300 µl de Isopropanol.
- ✓ Misturar e incubar por pelo menos 5 minutos à temperatura ambiente.
- ✓ Centrifugar por 10 minutos à velocidade máxima e temperatura ambiente.
- ✓ Descartar o sobrenadante e suspender o “*pellet*” em 100 µl de TE.

**Prosseguir com o Passo II de purificação se o “*pellet*” não se mostrar muito escuro (sujo)**

- ✓ Adicionar 20 µl de Acetato de Potássio 8 M.
- ✓ Misturar e incubar por 15 minutos à temperatura ambiente.
- ✓ Centrifugar por 15 minutos à velocidade máxima e temperatura ambiente.
- ✓ Recuperar o sobrenadante e adicionar 0,6 volume (75 µl) de Isopropanol, misturar e incubar por pelo menos 5 minutos à temperatura ambiente.
- ✓ Centrifugar por 15 minutos à velocidade máxima e temperatura ambiente.
- ✓ Lavar o “*pellet*” uma vez com Etanol 70% gelado.
- ✓ Suspender o “*pellet*” em 100 µl de TE.

➤ **Purificação - Passo II** (Wizard DNA Clean-Up System)

- ✓ Remover e colocar de lado o êmbolo de uma seringa descartável de 3,0 ml. Acoplar a ponta da seringa à extremidade da minicoluna.
- ✓ Misturar vigorosamente a resina “Wizard DNA Clean-Up” (Promega). Se necessário, aquecer a resina a 25°-37°C (~10 minutos) para dissolver quaisquer cristais. Não usar a resina acima de 30°C.
- ✓ Adicionar 1,0 ml da resina “Wizard DNA Clean-Up” a um tubo de microcentrífuga (1,5 ml). Adicionar a amostra (100 µl) à resina “Wizard Clean-Up” e misturar invertendo o tubo gentilmente várias vezes.
- ✓ Pipetar a resina “Wizard Clean-Up” contendo o DNA ligado para dentro da seringa. Inserir o êmbolo lentamente e empurrar gentilmente a mistura para dentro da minicoluna com o êmbolo da seringa.
- ✓ Desacoplar a seringa da minicoluna e remover o êmbolo da seringa. Acoplar a seringa novamente a minicoluna.
- ✓ Para lavar a coluna, adicionar 2,0 ml de Isopropanol 80% à seringa. Inserir o êmbolo e empurrar gentilmente a solução através da minicoluna.
- ✓ Remover a seringa e transferir a minicoluna para um tubo de microcentrífuga. Centrifugar a minicoluna por 20 segundos à velocidade máxima em microcentrífuga a fim de secar a resina.

- ✓ **Opcional:** Se o Isopropanol residual for afetar manipulações subseqüentes da amostra de DNA, deixar a minicoluna à temperatura ambiente por 5-15 min para evaporação do Isopropanol.
- ✓ Transferir a minicoluna para um outro tubo de microcentrífuga. Adicionar 50 µl de água ou tampão TE pré-aquecido (60°-70°C) a minicoluna e esperar 5 min. (o DNA permanecerá intacto na minicoluna por até 30 min).
- ✓ Centrifugar a minicoluna por 20 segundos a 12.000 Xg para eluir o DNA ligado.
- ✓ Repetir os dois últimos passos uma vez.
- ✓ Remover e descartar a minicoluna. O DNA purificado pode ser estocado a -20°C.

Se necessário (como julgado pela cor da amostra de DNA e/ou pela capacidade deste de ser amplificado ou restringido), repetir todos os passos do *Passo II* a fim de melhorar purificação.

#### **4.10 PCR (“Polymerase chain reaction” ou reação de polimerização em cadeia)**

No presente trabalho, a partir do DNA extraído do solo, foram obtidos fragmentos de DNAr 16S, utilizando-se a técnica do PCR com primers homólogos a regiões conservadas do gene RNAr 16S (ver a Tabela 8). Os primers usados foram os seguintes: - F243 e R513GC específicos para o grupo de actinomicetos; - R1378 e F984GC que amplificam o DNA 16S do Domínio Bacteria. Foram realizadas duas abordagens de estudo:

- 1°. Análise da comunidade de actinomicetos do solo;
- 2°. Análise da comunidade bacteriana do solo.

As ampliações realizadas foram feitas com o uso de um termociclador “Gene Amp PCR System 2400” (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Conn.).

**Tabela 8.** Primers usados nos experimentos com PCR.

| Primer <sup>a</sup> | DNAr 16S alvo (posição) <sup>b</sup> | Seqüência (5'→3')                                    |
|---------------------|--------------------------------------|--|
| <b>F243</b>         | Actinomicetos (226-243)              | GGATGAGCCCCGCGGCCTA                                  |
| <b>R513GC</b>       | Actinomicetos e outros (513-528)     | GC.-CGGCCGCGGCTGCTGGCACGTA                           |
| <b>F984GC</b>       | Bacteria (968-984)                   | GC.-AACGCGAAGAACCTTAC                                |
| <b>R1378</b>        | Bacteria (1378-1401)                 | CGGTGTGTACAAGCCCCGGGAACG                             |
| <b>GC.</b>          |                                      | 5'-CGCCCCGGGGCGCGCCCCGGG CGGG<br>GCGGGGGCACGGGGGG-3' |

<sup>a</sup>F, forward primer; R, reverse primer; GC., seqüência rica em G+C anexada ao final 5' da molécula de DNA.

<sup>b</sup>numeração relativa ao DNAr 16S de *E. coli*.

Para as ampliações específicas de fragmentos de DNAr 16S do Domínio Bacteria, a mistura de reação (volume final de 100 µl) é descrita a seguir: 0,8 µl de Taq DNA polimerase (5 U/µl), 10,0 µl de tampão da Taq (1x) (já contendo MgCl<sub>2</sub>), 5,0 µl de DMSO (5%), 0,8 µl de dNTP's (0,2 mM), 2,0 µl de F984 (0,4 µM) e 2,0 µl de R1378 (0,4 µM). A amplificação para o Domínio Bacteria ocorreu seguida de 35 ciclos variando-se a temperatura entre 94°C (por 1 minuto), 60°C (por 1 minuto) e 72°C (por 2 minutos) respectivamente; 10 ciclos variando-se a temperatura entre 60°C (por 30 segundos) e 72°C (por 1 minuto) respectivamente; finalmente um resfriamento à 4°C.

Para as ampliações de fragmentos de DNAr 16S de actinomicetos, a mistura de reação foi a mesma utilizada nas ampliações para fragmentos do Domínio Bacteria. Para a amplificação de fragmentos de actinomicetos, foram utilizados 35 ciclos variando-se a temperatura entre 94°C (por 1 minuto), 63°C (por 1 minuto) e 72°C (por 2 minutos) respectivamente; um período de 10 minutos a 72°C e, finalmente, um resfriamento à 4°C.

#### 4.11 DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* – Eletroforese em Gel de gradiente desnaturante)

Em contraste com outros modelos de “fingerprinting”, modelos de análise baseados em DGGE oferecem a possibilidade da análise de bandas que não são visualizadas em outros métodos. No trabalho em questão, onde as amostras foram de solo, as bandas têm representatividade apenas para os principais constituintes da comunidade analisada. Se presente em menores quantidades, grupos como o dos actinomicetos poderiam não ser detectados por este tipo de análise molecular. HEUER *et al.* (1997) já utilizaram o PCR e em seguida o DGGE para detecção de comunidades e análise de diversidade de actinomicetos em diferentes tipos de solo, obtendo sucesso.

O sistema de DGGE que foi utilizado é um “D Code<sup>TM</sup> - Universal Mutation Detection System” (Bio-Rad, Inc., Hercules, Califórnia) e foi utilizado exatamente como descrito pelos fabricantes no manual de instruções. Os géis paralelos foram feitos variando-se a concentração de desnaturante de 55 a 60%. Os géis polimerizaram pela adição de 150 µl de persulfato de amônio 10% e 14 µl de TEMED (para uma concentração final de 0,09%). As eletroforeses ocorreram a uma voltagem constante de 50 V a temperatura de 60°C por 14 horas. As alíquotas de PCR adicionadas no gel foram de 15 µl (aproximadamente 200 ng). Os géis foram corados com 10 ml de solução de coloração (TAE 1x contendo 1µg/ml de Syber-green). Finalmente os géis foram fotografados com uma câmara Polaroid preto e branco. As fotos foram registradas através de um “scanner” e gravadas em computador. Não foi utilizado nenhum programa de computador para a análise das fotos, todas foram analisadas a olho nu.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

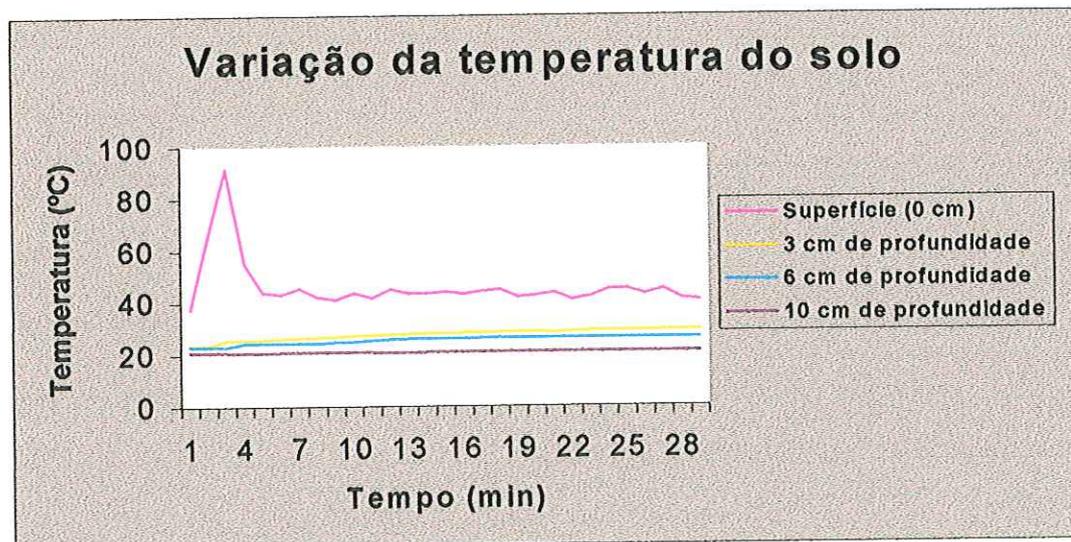
### 5.1 Condições da área estudada: temperatura, pluviosidade, composição do solo.

A área, situada em uma região do Estado de São Paulo considerada uma das mais produtivas em termos da agricultura da cana-de-açúcar, com latossolo vermelho, foi escolhida pelo conhecimento prévio sobre as práticas da propriedade (Sítio Paraíso, Estrada de Tamoio, Município de Araraquara) em relação ao cultivo e manejo da colheita da cana-de-açúcar, bem como pela existência de uma mata preservada por no mínimo sessenta anos ao lado do local teste. A Bacia Hidrográfica em que se insere a área de estudo é a do Tietê-Jacaré, de acordo com a mais recente caracterização das unidades de gerenciamento de recursos hídricos do Estado de São Paulo, e na qual se destaca o Rio Chibarro, dentro do Município de Araraquara.

Foi escolhida uma fração da área de cultivo, cerca de 500 metros quadrados, e desta delimitou-se um metro quadrado para as coletas. As coletas na mata preservada, considerada uma região controle, foram feitas sempre em um mesmo ponto, respeitando-se cerca de 40 metros da estrada que separava a área de cultivo. As amostras controle, da mata *60 anos*, foram importantes para a comparação com resultados daquelas retiradas de solos cultivados por mais de vinte anos com cana-de-açúcar. A distância entre a mata *60 anos* e o solo do canavial estudado era cerca de 250 metros.

O cultivo da cana-de-açúcar na área de estudo sempre empregou a fertilização química (NPK) e, eventualmente, a aplicação de vinhaça. Uma vez realizado o plantio, a primeira colheita ocorria após dezoito meses, e então se repetia a cada doze meses, por mais três ou quatro vezes, quando novo plantio era realizado. No presente trabalho, o plantio se encontrava no estágio de terceiro corte, sem fertilização. Assim, a queima do canavial se deu no final do mês de Novembro de 1999, ocorrendo o corte imediatamente após a queima, realizada manualmente. Os

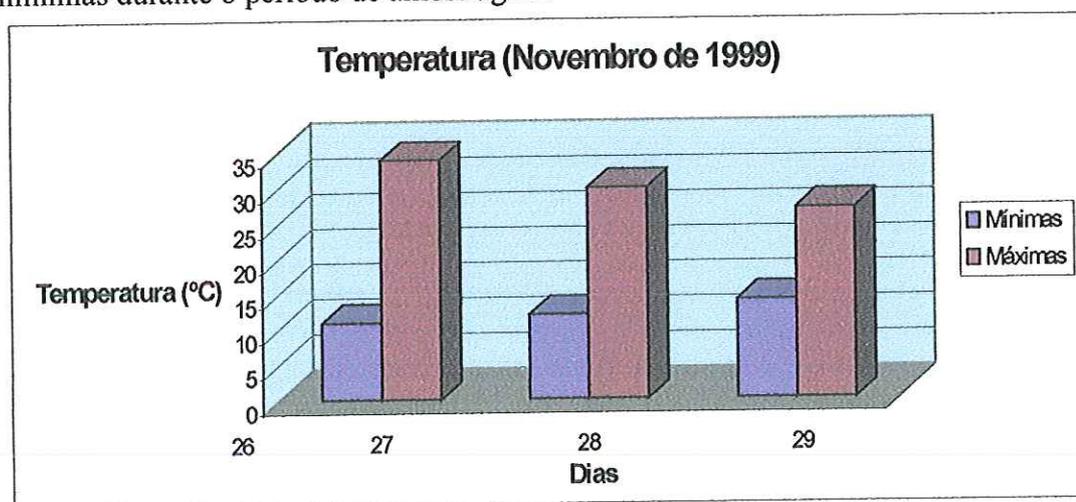
valores da temperatura determinados durante o processo de queima estão apresentados na Figura 11.



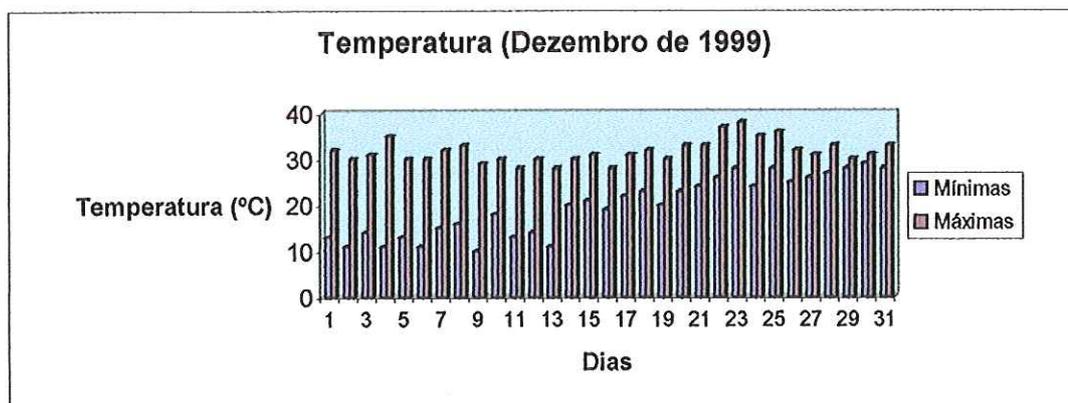
**Figura 11.** Valores da temperatura do solo, em diferentes profundidades, do canal localizado no Sítio Paraíso exposto à queima.

O fogo provocado pela queimada alcançou um pico próximo de 90°C na superfície do solo. Porém a partir dos 3,0 cm de profundidade a elevação da temperatura foi mínima. Sendo assim, o solo se mostrou um bom isolante térmico e reduziu a ação do fogo apenas à superfície.

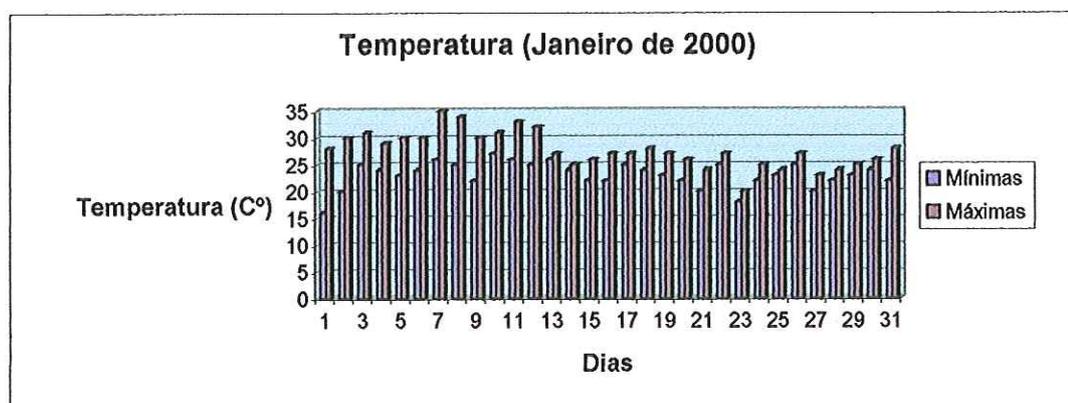
As Figuras 12 a 16 mostram as variações diárias de temperaturas máximas e mínimas durante o período de amostragem.



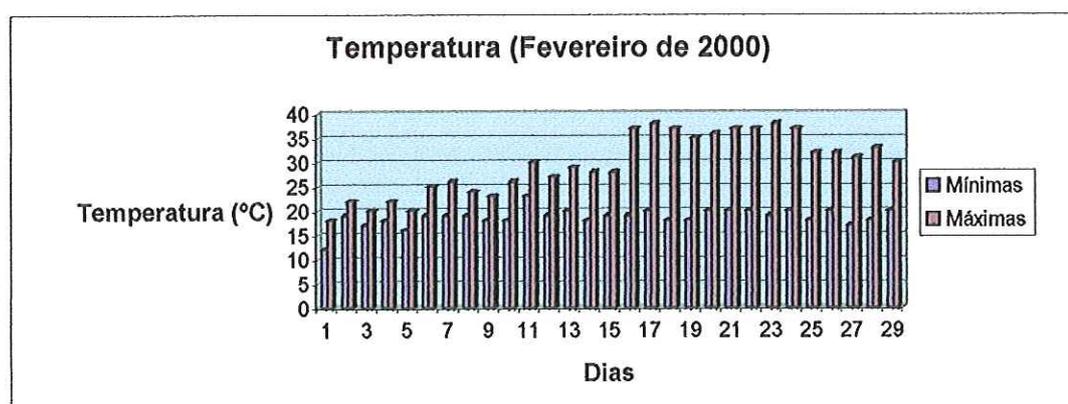
**Figura 12.** Valores das temperaturas máximas e mínimas dos dias 27 a 29 de Novembro de 1999, Sítio Paraíso (no dia 27 foi realizada a primeira amostragem do trabalho – antes da queima).



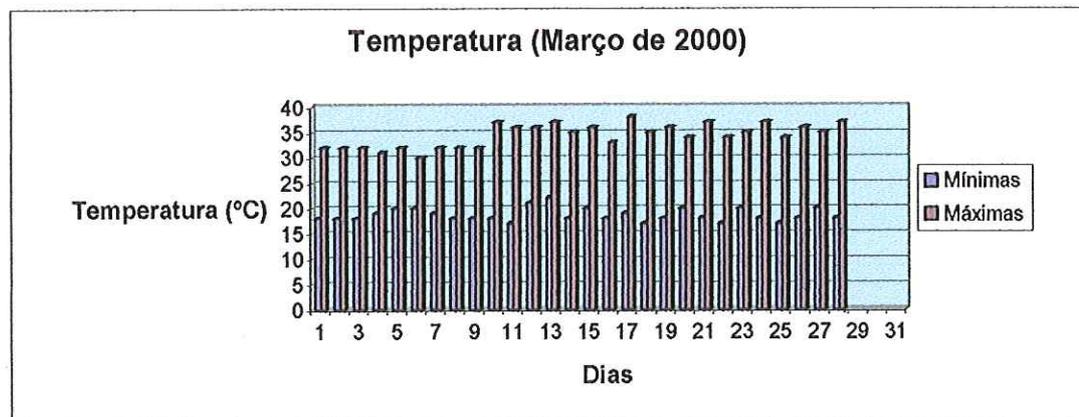
**Figura 13.** Valores das temperaturas máximas e mínimas no mês de Dezembro de 1999 no Sítio Paraíso.



**Figura 14.** Valores das temperaturas máximas e mínimas no mês de Janeiro de 2000 no Sítio Paraíso.



**Figura 15.** Valores das temperaturas máximas e mínimas no mês de Fevereiro de 2000 no Sítio Paraíso.

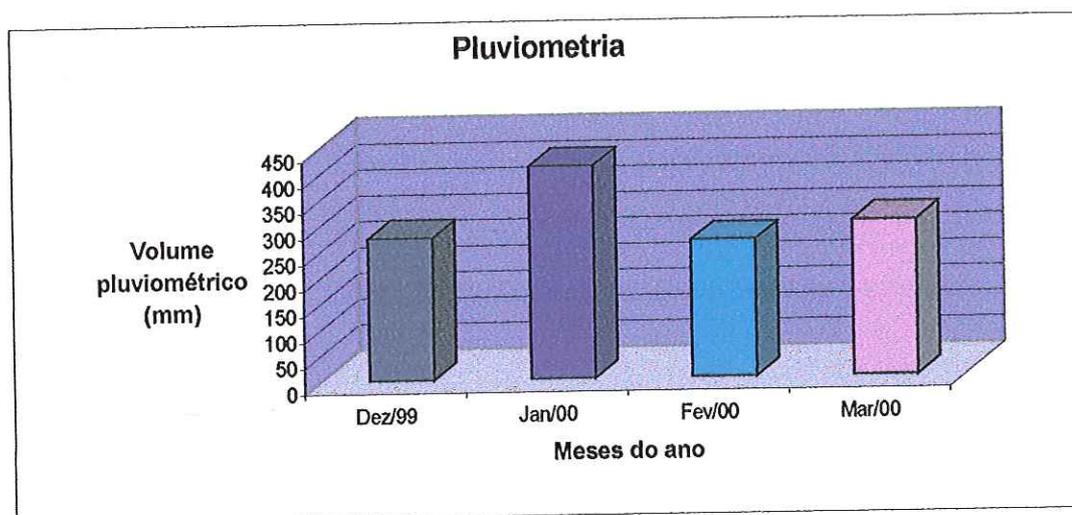


**Figura 16.** Valores das temperaturas máximas e mínimas entre os dias 1 e 28 de Março de 2000 no Sítio Paraíso (no dia 28 foi realizada a última amostragem do trabalho).

Como pode ser observado nas Figuras 11 a 15, as temperaturas médias registradas no período entre as amostragens foram: 25, 28, 25 e 27°C, para Dezembro, Janeiro, Fevereiro e Março respectivamente. Nos últimos três dias do mês de Novembro foi registrada uma média de 23°C. Esta temperatura média ambiental garante temperaturas próximas a 20°C nos primeiros centímetros de profundidade do solo. Esta temperatura do solo está caracterizada dentro da faixa mesofílica de crescimento bacteriano. Sendo assim, as comunidades bacterianas, do solo aqui estudado, devem ser constituídas principalmente por populações de bactérias mesofílicas.

A Figura 17 mostra as medidas pluviométricas para o período em que ocorreram as amostragens.

A água, uma necessidade fisiológica para todo ser vivo, é, do ponto de vista ecológico, um fator limitante para os ambientes terrestres. Nas amostras coletadas, em profundidades como as estudadas, da superfície a 6 cm, a umidade pode ser um fator limitante, e está diretamente relacionada ao regime pluviométrico. Devido ao ritmo diário da umidade da natureza, mais elevada a noite e menor durante o dia, promove-se uma regulação da atividade microbiana no solo, limitando-se a sua distribuição (ODUM, 1993). A disponibilidade hídrica para o solo foi avaliada, neste trabalho, na forma de períodos curtos de interrupção da precipitação, chamados de veranicos (Tabela 9).



**Figura 17.** Valores das medidas pluviométricas nos períodos amostrados, no Sítio Paraíso.

No dia 27 de Novembro de 1999 foram retiradas as primeiras amostras de solo (no período da manhã, antes da queima do canavial e no final da tarde do mesmo dia, após a queima). Somente depois de aproximadamente quatro meses (dia 28 de Março de 2000) foi retirada a última amostra do solo do canavial.

Neste período de interamostragens, foram registrados 1252 mm de precipitação, nove dias secos (ds) e dezoito períodos contínuos sem precipitação (pc). A precipitação total do período foi elevada, visto que, segundo MORAES (2001), para esta região são esperados 1500 mm de precipitação por ano. Os valores indicam que o teor de água no solo não foi um fator limitante para o desenvolvimento de culturas microbianas. Porém, se forem analisados os parâmetros “ds” e “pc” esta indicação pode ser diferente. Segundo ASSAD *et al.* (1993) estes parâmetros estão relacionados aos curtos períodos de interrupção da precipitação. Se o tempo de surgimento de novas gerações microbianas (de algumas horas) não fosse tão breve, estes parâmetros não seriam significantes. Como os 1252 mm de precipitação, registrados no período, não foram distribuídos de forma homogênea, os crescimentos das diferentes populações bacterianas, principalmente as da superfície do solo, podem ter sido afetados durante os veranicos pelo déficit hídrico.

A heterogeneidade na distribuição da precipitação no período pode ser observada na Tabela 9 onde foram registrados os parâmetros “ds” e “pc”. Nos meses em estudo, foram registrados vinte e sete períodos sem precipitação (soma de “ds” e “pc”) com duração de um ou mais dias. Deste modo, a água apesar de não ter sido

um fator limitante no período como um todo, durante estes dias ela pode ter interferido. Nos dias da primeira e última amostragem, respectivamente dias 27/11/1999 e 28/03/2000, não foram registradas precipitações. Deste modo, as populações bacterianas, das amostras retiradas antes e após quatro meses da queima, estavam em condições semelhantes, quanto à disponibilidade hídrica.

**Tabela 9.** Número de veranicos no período (Dezembro de 1999 a Março de 2000).

| <b>Mês</b>                                   | <b>Dezembro</b>   | <b>Janeiro</b>    | <b>Fevereiro</b>  | <b>Março</b>      |
|--|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|  | <b>Intervalos</b> | <b>Intervalos</b> | <b>Intervalos</b> | <b>Intervalos</b> |
|  | <b>(dias)*</b>    | <b>(dias)*</b>    | <b>(dias)*</b>    | <b>(dias)*</b>    |
|  | 01 – 02           | 09 – 11           | 03                | 01 – 03           |
|  | 06 – 08           | 15 – 17           | 07                | 05 – 06           |
|  | 13                | 19                | 15                | 08 – 09           |
|  | 15 – 22           | 21 – 24           | 17 – 18           | 11                |
|  | 24 – 29           | 27 – 30           | 21 – 25           | 13 – 14           |
|  | 30 – 31           |                   | 27                | 16 – 17           |
|  |                   |                   | 29                | 20 – 21           |
|  |                   |                   |                   | 23                |
|  |                   |                   |                   | 28 – 31           |
| <b>ds</b>                                    | 01                | 01                | 05                | 02                |
| <b>pc</b>                                    | 05                | 04                | 02                | 07                |
| <b>Total de precipitação no período (mm)</b> | 276               | 411               | 265               | 300               |

\*Dias onde a precipitação foi menor ou igual a 1 mm.

ds: número de dias secos. pc: número de períodos contínuos sem precipitação.

As características dos solos estudados neste trabalho, tanto o cultivado como o da área protegida, foram também analisadas em função dos parâmetros relacionados ao conteúdo de micronutrientes (Cu, Fe, Mn e Zn) (Tabela 12) e macronutrientes (P, K, Ca, Mg, Al) (Tabela 11), bem como a granulometria (Tabela 10). Os resultados da composição dos solos estudados não refletem a realidade da fertilidade dos mesmos, em função de serem coletas pontuais, realizadas apenas para possibilitar a avaliação das condições nutricionais do meio para a microbiota presente. As amostras de solo de canavial foram coletadas uma única vez em cada uma das três situações a seguir: antes da queima (27/11/1999, no período da manhã), depois da queima (27/11/1999, no período da tarde) e quatro meses depois da queima (28/03/2000, no período da manhã).

O solo estudado recebeu adubação durante seu período inicial de plantio, empregando-se adubo NPK (10-10-10). O ano posterior recebeu adubação com adubo de cobertura NPK (25-5-20). No período anterior ao presente trabalho, não foi feita adubação do solo após o corte (ou seja, do segundo para o terceiro corte). A cana-de-açúcar foi queimada e as primeiras amostras foram coletadas. Depois da queima foi utilizado o adubo NPK (25-5-20). Após quatro meses, foi então realizada a segunda amostragem.

As propriedades de um ecossistema do solo não são somente um produto de sua natureza física, biológica e de seus componentes químicos. Na verdade são o resultado de uma interação de todos estes componentes bióticos e abióticos. Nenhuma destas partes é imutável e suas modificações estão sempre relacionadas a associações com os seres que ali vivem (fungos, bactérias e invertebrados em geral). Como já comentado anteriormente, o sistema biológico do solo sofre modificações constantes no seu ambiente, modificações estas que contribuem para o crescimento e desenvolvimento de comunidades microbinas, tudo dentro de um processo de co-evolução. Logo, é de vital importância o conhecimento das implicações das condições do solo nos processos biológicos. Segundo TATE (1995), argila e matéria orgânica coloidal são, dentre as partículas comumente encontradas no solo, as que apresentam o menor diâmetro. Sendo assim, solos ricos em argila e matéria orgânica coloidal apresentam maior superfície de interação com microorganismos.

O solo de mata *60 anos* estudado neste trabalho mostrou ser composto de 28,4% de areia, 52,5% de argila e 19,1% de silte (Tabela 10), recebendo a classificação de solo argiloso, segundo as classes texturais do sistema norte americano de solos. O solo de cana-de-açúcar, com as porcentagens de 15,0% de areia, 37,2% de argila e 47,8% de silte (Tabela 10), recebe a classificação de solo barro argilo limoso, segundo as classes texturais do mesmo sistema. O solo da mata apresentou 59 g/dm<sup>3</sup> (Tabela 11) de matéria orgânica, e o de cana-de-açúcar 55g/dm<sup>3</sup> (Tabela 11). Ainda, é interessante acrescentar que todos os dados da Tabela 10 foram tomados em replicata, apresentando nas duas ocasiões os mesmos resultados. Ambos os solos mostraram-se ricos em argila e apresentaram elevada concentração de matéria orgânica (Tabelas 10 e 11). Portanto, quanto às características físicas e de

conteúdo de matéria orgânica os solos estudados constituem um ótimo substrato para o desenvolvimento de organismos.

**Tabela 10.** Granulometria dos solos de cana-de-açúcar e mata 60 anos.

|      | Areia Total (g/Kg) | Argila (g/Kg) | Silte (g/Kg) |
|------|--------------------|---------------|--------------|
| Cana | 150                | 372           | 478          |
| Mata | 284                | 525           | 191          |

**Tabela 11.** Valores dos parâmetros analisados dos solos de cana-de-açúcar e mata 60 anos.

| Parâmetros  | Mata | Cana | Cana Queimada | Cana 4 meses depois |
|---|------|------|---------------|---------------------|
| pH (medido em água)   | 5,0  | 7,3  | 7,0           | 6,2                 |
| pH (medido em CaCl <sub>2</sub> )                           | 4,4  | 7,1  | 7,2           | 6,2                 |
| Matéria Orgânica (g/dm <sup>3</sup> )                       | 59   | 55   | 40            | 38                  |
| P (extrator-resina) (mg/dm <sup>3</sup> )                   | 45   | 189  | 19            | 13                  |
| K (mmol/dm <sup>3</sup> )                                   | 3,8  | 8,5  | 0,6           | 0,5                 |
| Ca (mmol/dm <sup>3</sup> )                                  | 22   | 592  | 22            | 22                  |
| Mg (mmol/dm <sup>3</sup> )                                  | 10   | 42   | 7             | 7                   |
| H+Al (mmol/dm <sup>3</sup> )                                | 80   | 11   | 40            | 38                  |
| Al (mmol/dm <sup>3</sup> )                                  | 8    | 0    | 0             | 0                   |
| CTC (capacidade de troca catiônica) (mmol/dm <sup>3</sup> ) | 115  | 654  | 69            | 68                  |
| S (soma das bases – Ca+Mg+K) (mmol/dm <sup>3</sup> )        | 36   | 642  | 30            | 30                  |
| V (saturação de bases – S/CTC) (%)                          | 31   | 98   | 43            | 44                  |
| M (saturação do alumínio) (%) (Ca+Mg)/K                     | 18   | 0    | 0             | 0                   |
|   | 8    | 75   | 49            | 56                  |

**Tabela 12.** Composição dos micronutrientes dos solos de cana-de-açúcar e mata 60 anos.

| Parâmetro                | Mata | Cana | Cana Queimada | Cana 4 meses depois |
|--------------------------|------|------|---------------|---------------------|
| Cu (mg/dm <sup>3</sup> ) | 10,5 | 3,1  | 3,8           | 3,7                 |
| Fe (mg/dm <sup>3</sup> ) | 117  | 41   | 16            | 15                  |
| Zn (mg/dm <sup>3</sup> ) | 2,8  | 5,3  | 0,7           | 0,6                 |
| Mn (mg/dm <sup>3</sup> ) | 70,3 | 27,8 | 25,8          | 22,3                |

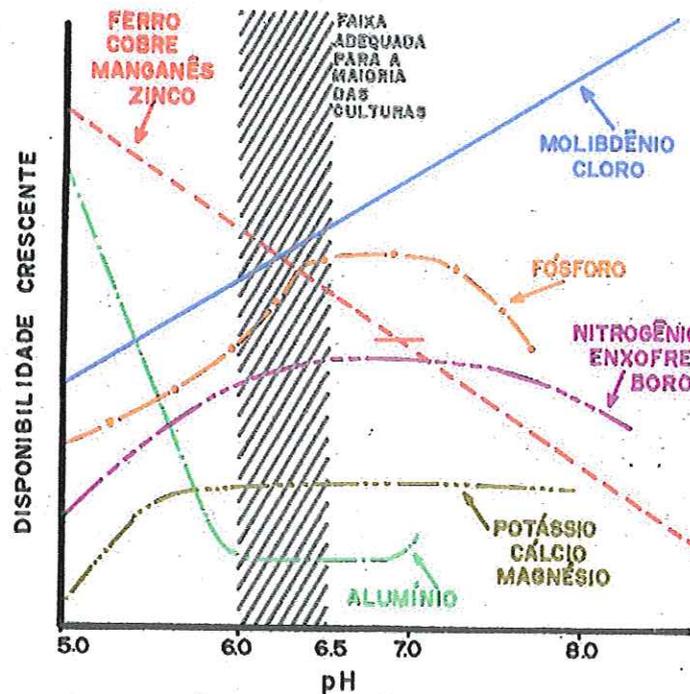
Para sobreviverem no solo, que é um ambiente em constante modificação, os microorganismos se adaptam e utilizam as mais diversas fontes de energia (luz,

determinados compostos inorgânicos), e sob as mais diversas condições ambientais (por exemplo, variação na concentração de oxigênio, temperatura etc.). A adaptação da vida no solo faz com que ocorram, com certa frequência, espécies de microorganismos com extraordinária plasticidade nutricional e que podem mudar seu conjunto de enzimas, para assim, sobreviverem nas mais diversas condições, explorando situações (aeróbias ou anaeróbias, litotróficas ou organotróficas), ou mesmo diferentes fontes de carbono e nitrogênio (NEVES, 1992). O solo de canavial, aqui estudado, apresentou um histórico de constantes interferências provocadas pelo homem, tais como, as práticas comuns da adubação e da queima. Sendo assim, provavelmente, as populações bacterianas deste solo foram forçadas, de tempos em tempos, a readaptação ao meio modificado.

Cerca da metade dos elementos da tabela periódica é essencial para as plantas ou animais ou na maioria dos casos, para os dois (ODUM, 1993). No solo, segundo NEVES (1992), diversos elementos são necessários aos microorganismos, relacionados principalmente ao funcionamento das várias enzimas. Os macronutrientes potássio, magnésio e cálcio são necessários em concentrações de  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$  M, enquanto que os micronutrientes, são necessários em concentrações de  $10^{-6}$  a  $10^{-8}$  M, o que torna tecnicamente impossível demonstrar deficiência de micronutrientes em microorganismos. Quanto à absorção destes nutrientes, segundo TATE (1995), a maior parte dos íons inorgânicos, monossacarídeos e aminoácidos é absorvida por transporte ativo que é altamente seletivo, devido à mediação de enzimas específicas para cada substância e conhecidas como permeases.

Neste trabalho foram realizadas algumas análises sobre as condições dos solos estudados, baseadas nas análises comuns sobre fertilidade realizadas pela EMBRAPA (Tabelas 11 e 12). Dentro desta análise de fertilidade foram estimadas as concentrações dos macronutrientes (potássio, cálcio e magnésio) e dos micronutrientes (cobre, ferro, zinco e manganês). Comparando-se estes dados com os dados das Tabelas 15 (Classes para teores de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ) e 16 (classes para teores de Cu, Fe, Mn e Zn), observa-se que ambos solos não apresentaram deficiências para estes elementos, e sim o excesso de alguns, como cálcio, magnésio e os micronutrientes para ambos os solos e potássio no solo da cana-de-açúcar, este último provavelmente devido à adubação com NTK. As amostras de solo de canavial

antes da queima e as da mata mostraram-se ricas em todos os micro e macronutrientes (Tabelas 11 e 12). A disponibilidade destes elementos para os microrganismos poderia ser um fator limitante somente se o pH não fosse favorável. A disponibilidade dos elementos está diretamente ligada a faixas de pH do meio, onde cada elemento tem um intervalo ótimo de pH para ser assimilado (Figura 18).



**Figura 18.** Valores de pH e comportamento da disponibilidade dos elementos no solo. Fonte: LOPES (1978).

O pH do solo de canavial medido antes da queima foi igual a 7,3 (em água) e de 7,1 (em cloreto de cálcio) (Tabela 11). Analisando-a Figura 17, verifica-se que a disponibilidade dos macronutrientes em função do pH antes da queima estava adequada. A disponibilidade dos micronutrientes, no solo do canavial antes da queima, estava abaixo da ideal. Como, após a queima do canavial, o pH se manteve praticamente constante, a disponibilidade dos macros e micronutrientes não foi alterada. Porém, quatro meses após a queima, o pH sofreu uma queda de aproximadamente um ponto quando medido em água ou cloreto de magnésio (Tabela 11). Esta queda no valor do pH melhorou as condições de absorção dos micronutrientes. Sendo assim, a queima não parece ter causado efeito relevante nos valores de pH do solo, nem na constituição de macro e micro-nutrientes.

O pH (Tabela 11) para o solo de mata *60 anos* foi igual a 5,0 (em água) e 4,4 (em cloreto de cálcio). Portanto, na mata *60 anos*, os macronutrientes estavam disponíveis dentro de um limite adequado, porém, para os micronutrientes, a disponibilidade estava acima da ideal. A absorção destes nutrientes é fundamental para o funcionamento do metabolismo bacteriano, principalmente o enzimático. Sendo assim, os teores, dos macros e micronutrientes do solo, dificilmente tiveram uma ação limitadora ao desenvolvimento dos organismos presentes nos solos estudados.

Após a queima do canavial, os teores de potássio, cálcio, magnésio, ferro e zinco no solo diminuíram abruptamente e mantiveram estas concentrações praticamente constantes após quatro meses (Tabelas 11 e 12). As Tabelas 15 e 16 trazem os valores para comparação dos teores de cálcio e magnésio, e cobre, ferro, magnésio e zinco, respectivamente. O pH medido foi praticamente o mesmo (7,0) depois da queima do canavial tendo uma redução para 6,0 depois de quatro meses. Sendo assim, depois do período de quatro meses houve uma diminuição benéfica do pH (tabela 11) que não foi acompanhada por um aumento dos teores da maioria dos macros e micronutrientes.

Outro elemento importante para as comunidades microbianas do solo é a presença dos sais de fosfato. De todos os elementos presentes nos microorganismos, talvez o fósforo seja o mais importante. Ele está presente sob a forma de nucleotídeos, ácidos nucléicos e fosfossacarídeos (NEVES, 1992). Nas amostras de solo aqui estudadas os valores de fósforo foram de 189 mg/dm<sup>3</sup>, 19 mg/dm<sup>3</sup>, 13 mg/dm<sup>3</sup> e 45 mg/dm<sup>3</sup> respectivamente para solo de canavial antes da queima, solo de canavial depois da queima, solo de canavial depois de quatro meses e em solo de mata *60 anos* (Tabela 11). Comparando-se estes valores aos da Tabela 13, verificou-se que os valores encontrados são altos para os solos da mata *60 anos* e da cana-de-açúcar antes da queima, sendo que o solo de mata tem uma concentração acima da ótima e o solo de canavial tem uma concentração de fósforo muito acima da ótima.

Depois da queima do canavial observou-se uma redução dos teores de fósforo para valores bem inferiores, sendo que, não ocorreu uma recuperação natural desse elemento no solo no período posterior de quatro meses.

Tabela 13. Disponibilidade de P (fósforo) no solo de diferentes culturas.

| Teor        | K <sup>+</sup> trocável<br>mmol/dm <sup>3</sup> | P resina   |         |         |            |
|-------------|---|------------|---------|---------|------------|
|             |   | Florestais | Perenes | Anuais  | Hortaliças |
| Muito baixo | 0,0 – 0,7                                       | 0 – 2      | 0 – 5   | 0 – 6   | 0 – 10     |
| Baixo       | 0,8 – 1,5                                       | 3 – 5      | 6 – 12  | 7 – 15  | 10 – 25    |
| Médio*      | 1,6 – 3,0                                       | 6 – 10     | 13 – 30 | 16 – 40 | 25 – 60    |
| Alto*       | 3,1 – 6,0                                       | 10 – 20    | 31 – 60 | 41 – 81 | 61 – 120   |
| Muito alto  | > 6,0   | > 20       | > 60    | > 80    | > 120      |

\*Valores ótimos para uma boa produtividade do solo.

Fonte: Empresa brasileira de pesquisa agropecuária (EMBRAPA) – centro de pesquisa de pecuária do sudeste (CPPSE).

Tabela 14. Limites de interpretação de classes para o pH e para a saturação por bases.

| Acidez      | pH em CaCl <sub>2</sub> | Saturação por bases | V (%)   |
|-------------|-------------------------|---------------------|---------|
| Muito alta  | Até 4,3                 | Muito baixa         | 0 – 25  |
| Alta        | 4,4 – 5,0               | Baixa               | 26 – 50 |
| Média*      | 5,1 – 5,5               | Média*              | 51 – 70 |
| Baixa*      | 5,6 – 6,0               | Alta*               | 71 – 90 |
| Muito baixa | > 6,0                   | Muito alta          | > 90    |

\*Valores ótimos para uma boa produtividade do solo.

Fonte: Empresa brasileira de pesquisa agropecuária (EMBRAPA) – centro de pesquisa de pecuária do sudeste (CPPSE).

Tabela 15. Limites de interpretação de classes para teores de Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>.

| Teor  | Ca <sup>2+</sup> trocável | Mg <sup>2+</sup> trocável |
|-------|---------------------------|---------------------------|
|       | mmol/dm <sup>3</sup>      |                           |
| Baixo | 0 – 3                     | 0 – 4                     |
| Médio | 4 – 7                     | 5 – 8                     |
| Alto  | > 7                       | > 8                       |

\*Valores ótimos para uma boa produtividade do solo.

Fonte: Empresa brasileira de pesquisa agropecuária (EMBRAPA) – centro de pesquisa de pecuária do sudeste (CPPSE).

Tabela 16. Limites de interpretação de classes para teores de Cu, Fe, Mn e Zn.

| Teor   | Cu                 | Fe     | Mn        | Zn        |
|--------|--------------------|--------|-----------|-----------|
|        | mg/dm <sup>3</sup> |        |           |           |
| Baixo  | 0 – 0,2            | 0 – 4  | 0 – 1,2   | 0 – 0,5   |
| Médio* | 0,3 – 0,8          | 5 – 12 | 1,3 – 5,0 | 0,6 – 1,2 |
| Alto*  | > 0,8              | > 12   | > 5,0     | > 1,2     |

\*Valores ótimos para uma boa produtividade do solo.

Fonte: Empresa brasileira de pesquisa agropecuária (EMBRAPA) – centro de pesquisa de pecuária do sudeste (CPPSE).

Quanto à disponibilidade do fósforo nos solos, em função do pH, o solo da mata *60 anos* apresentou valores que mostravam condições inferiores à ótima e o solo de canavial antes da queima esteve dentro de valores adequados. Para as amostras de solo depois da queima, mais uma vez, observou-se melhoria no pH não acompanhada de uma recuperação natural do teor do nutriente, no caso o fósforo.

O teor de alumínio no solo de mata *60 anos* foi baixo ( $8 \text{ mmol/dm}^3$ ), enquanto que no solo do canavial foi nulo para as três diferentes amostragens, antes da queima, depois da queima e 4 meses depois ( $0 \text{ mmol/dm}^3$ ) (Tabela 11). O excesso de alumínio torna-se um problema no solo devido a sua forma iônica ( $\text{Al}^{+3}$  - aqui representada pela relação  $\text{H}^+/\text{Al}$ ) que pode competir com a absorção de outros íons no solo. Esta competição aumenta inversamente aos valores de pH, ou seja, quanto maior o pH menor a disponibilidade do íon alumínio e maiores os teores de cálcio e magnésio disponíveis no solo (VASCONCELLOS, 1994). Em ambos solos, esta relação apresentou valores baixos,  $11 \text{ mmol/dm}^3$  para o solo de canavial antes da queima,  $40 \text{ mmol/dm}^3$  para o solo de canavial depois da queima,  $38 \text{ mmol/dm}^3$  para o solo de canavial quatro meses depois e  $80 \text{ mmol/dm}^3$  para o solo da mata *60 anos*. Como consequência destes valores, a saturação do alumínio ("M") foi de 18% no solo da mata *60 anos* e de zero no solo da cana-de-açúcar (Tabela 11). Sendo assim, nas amostras de solo aqui analisadas, o alumínio não apresentou teores que pudessem comprometer a absorção de nutrientes por parte dos microrganismos. A "CTC" (capacidade de troca catiônica) na camada arável de solos, onde há elevada concentração de matéria orgânica, geralmente varia de  $300$  a  $400 \text{ mmol/dm}^3$  em função de sua origem e de seu grau de decomposição (BROADBENT, 1953 *apud* VASCONCELLOS, 1994). Em latossolos há a predominância de cargas associadas à caolinita e à gibsitita (composição mineral da argila), sendo que no estado de São Paulo, a CTC de matéria orgânica varia de  $190$  a  $400 \text{ mmol/dm}^3$  (VASCONCELLOS, 1994). A CTC, além de estar ligada às cargas da argila, também está diretamente ligada às concentrações de matéria orgânica, de  $\text{Ca}^{2+}$ , de

$Mg^{2+}$  e  $K^{1+}$  (SILVA, 1995). No solo da mata *60 anos* estudada, o valor foi baixo ( $115 \text{ mmol/dm}^3$ ), provavelmente devido ao pH ser ligeiramente ácido. No solo do canavial mais uma vez verificou-se um valor mais elevado antes da queima ( $654 \text{ mmol/dm}^3$ ) (Tabela 11). Depois da queima do canavial, o valor da CTC decresceu para 69, e posteriormente, para 68 (após quatro meses). Estes baixos valores estão correlacionados à queda dos valores de matéria orgânica,  $40$  e  $38 \text{ g/dm}^3$  logo depois da queima e dos quatro meses para a segunda amostragem, respectivamente.

A saturação de bases (“V”) foi muito elevada no solo de canavial antes da queima (Tabela 11), aproximadamente 98%, o que pode indicar o excesso de insumos agrícolas na área. O solo da mata apresentou um “V” de aproximadamente 31%, um valor alto em relação aos 16% obtidos por SILVA (1995) em solo de mata nativa no Estado de Alagoas. Porém, depois da queima do canavial observou-se uma queda nos valores para 43 e 44% nas amostras retiradas logo após a queima e 4 meses depois, respectivamente. Isto ocorreu devido à diminuição também observada nos teores de cálcio, potássio, e magnésio. Para os microorganismos, estes valores para o “V”, reafirmam que não houve deficiência dos teores de cálcio, potássio, e magnésio.

A soma das bases (“S” – Ca, Mg e K) e a relação “(Ca+Mg)/K” estão altos no solo de cana antes da queima,  $642 \text{ mmol/dm}^3$  e 75, respectivamente, e baixos no solo da mata *60 anos*,  $36 \text{ mmol/dm}^3$  e 8 respectivamente (Tabela 11). Estes resultados confirmam os valores obtidos na medição do pH de ambos solos. Em solo de canavial o “S” é alto devido principalmente à alta concentração de cálcio. No solo de mata o inverso é observado devido a baixa concentração de potássio. Quanto a relação “(Ca+Mg)/K”, ocorre o mesmo. Em solo de cana valores muito altos para cálcio e magnésio e em solo de mata um valor baixo para o potássio. Depois da queima do canavial ocorreu uma queda do valor de “S” no solo de  $642$  para  $30 \text{ mmol/dm}^3$  devido principalmente à queda dos teores de cálcio, o que pode ter causado a leve redução no valor de pH. O mesmo ocorreu com os valores da relação “(Ca+Mg)/K” que caíram de 75 para 49 logo após a queima, e para 56, quatro meses depois.

Segundo PEREIRA *et al.* (2000), perturbações no solo de um sistema natural através de práticas agrícolas, como a calagem, têm resultado em desequilíbrios das populações na comunidade microbiana, favorecendo as populações de actinomicetos que preferem solos com pH alcalino. Porém, as amostras de solo, aqui estudadas, não apresentaram valores considerados críticos para nenhum dos parâmetros ou dos teores de elementos analisados, que pudessem causar problemas relevantes as comunidades de microrganismos. Portanto, as amostras de solo estudadas apresentaram boa fertilidade.

Após a queima, observou-se uma queda no teor de vários elementos, provavelmente devido à volatilização da matéria orgânica causada pelo aumento da temperatura (Tabela 11). Porém, a atenção maior é dada ao elemento fósforo devido a sua importância para o metabolismo dos microorganismos. A falta deste elemento limita o crescimento microbiano no solo afetando diretamente as comunidades que ali vivem. Sendo assim, a prática da queima da cana-de-açúcar pode ser perigosa para a microbiota do solo a longo prazo (vários anos).

## 5.2 Composição microbiana do solo – Os estudos com PCR e DGGE

Esta etapa do trabalho apresentou alguns problemas quanto à adequação dos métodos utilizados com as amostras colhidas para as análises. Ocorreram problemas nas extrações do DNA, problemas nas reações de amplificação, devido a dificuldades na purificação do mesmo, e problemas com a separação de bandas no gel de DGGE causados por uma escolha equivocada em um set de *primers*.

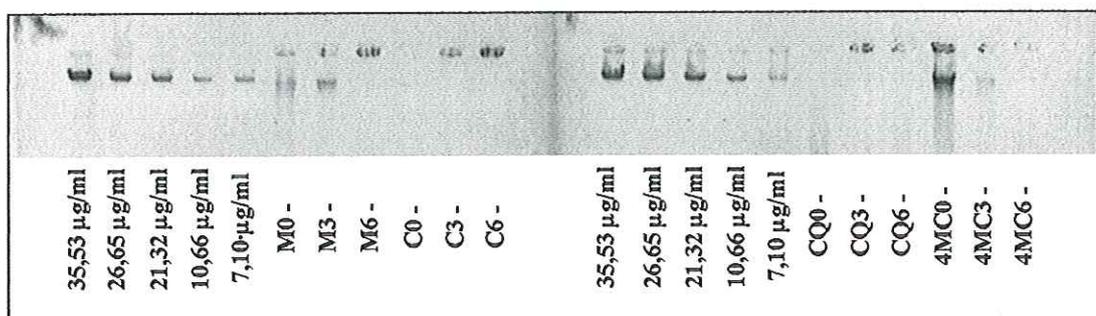
Quanto aos problemas da extração e posterior amplificação de DNA, eles foram divididos em duas etapas: lise das células e extração do DNA bruto; e a purificação do DNA bruto.

Alguns métodos de extração, que utilizam “bead-beater” (promove a lise mecânica) como o de SMALLA *et al.* (1993), foram testados e os rendimentos das extrações foram sempre insatisfatórios. Provavelmente o excesso de substâncias húmicas nas amostras de solo e a degradação do DNA, causada pelo bead-beater, foram os responsáveis por estes resultados negativos.

Os resultados indicam que o uso de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) no processo de lisi da célula em combinação com o tratamento de solução salina, aquecimento e resfriamento combinados, foram eficientes para um bom rendimento da extração de DNA do solo em questão.

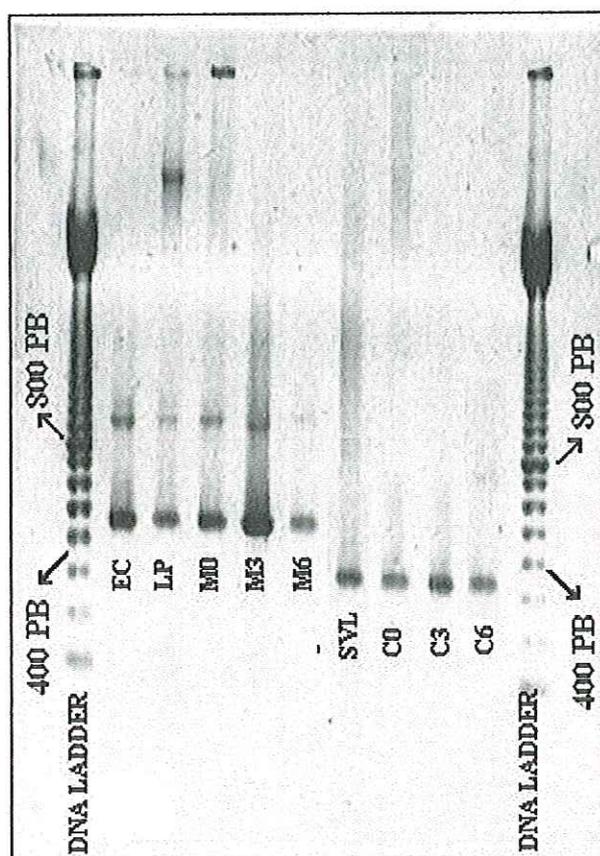
A purificação do DNA mostrou-se eficiente, somente depois de realizados os dois passos da purificação. Sendo que, no último passo, foi de fundamental importância o uso de duas colunas, do “Wizard DNA Clean-Up System”, para cada amostra. Somente depois de utilizar duas colunas por amostra as reações de PCR tiveram amplificação positiva (Figura 19).

Após a purificação do DNA extraído da comunidade microbiana, tanto do solo de mata quanto do solo de canavial, foi feita uma eletroforese, em gel de agarose 1%, com todas as amostras purificadas (Figura 19). As concentrações finais de DNA purificado (com amplificação positiva), em sua maioria, foram muito inferiores a 7,1  $\mu\text{g/ml}$  a ponto de nenhuma banda ser visualizada no gel. Somente as amostras M0 (>7,1 $\mu\text{g/ml}$ ), M3 ( $\approx 10,66\mu\text{g/ml}$ ), 4MC0 (<7,1 $\mu\text{g/ml}$ ) e 4MC3 (>35,53 $\mu\text{g/ml}$ ) tiveram valores superiores.



**Figura 19.** Gel de agarose 1% com amostras de  $\lambda$ DNA ([ ] estoque = 533,0 $\mu\text{g/ml}$ ) e DNA purificado da comunidade bacteriana presente no solo de mata e de canavial. Legenda: **M0** – DNA de solo de mata a 0cm de profundidade, **M3** - DNA de solo de mata a 3,0cm de profundidade, **M6** - DNA de solo de mata a 6,0cm de profundidade, **C0** - DNA de solo de canavial a 0 de profundidade, **C3** - DNA de solo de canavial a 3,0cm de profundidade, **C6** - DNA de solo de canavial a 6,0cm de profundidade, **CQ0**: Solo de cana queimada a 0 cm de profundidade, **CQ3**: Solo de cana queimada a 3,0 cm de profundidade. **CQ6**: Solo de cana queimada a 6,0 cm de profundidade, **4MC0** - DNA de solo de canavial 4 meses depois da queima a 0cm de profundidade, **4MC3** - DNA de solo de canavial 4 meses depois da queima a 3,0cm de profundidade, **4MC6** - DNA de solo de canavial 4 meses depois da queima a 6,0cm de profundidade.

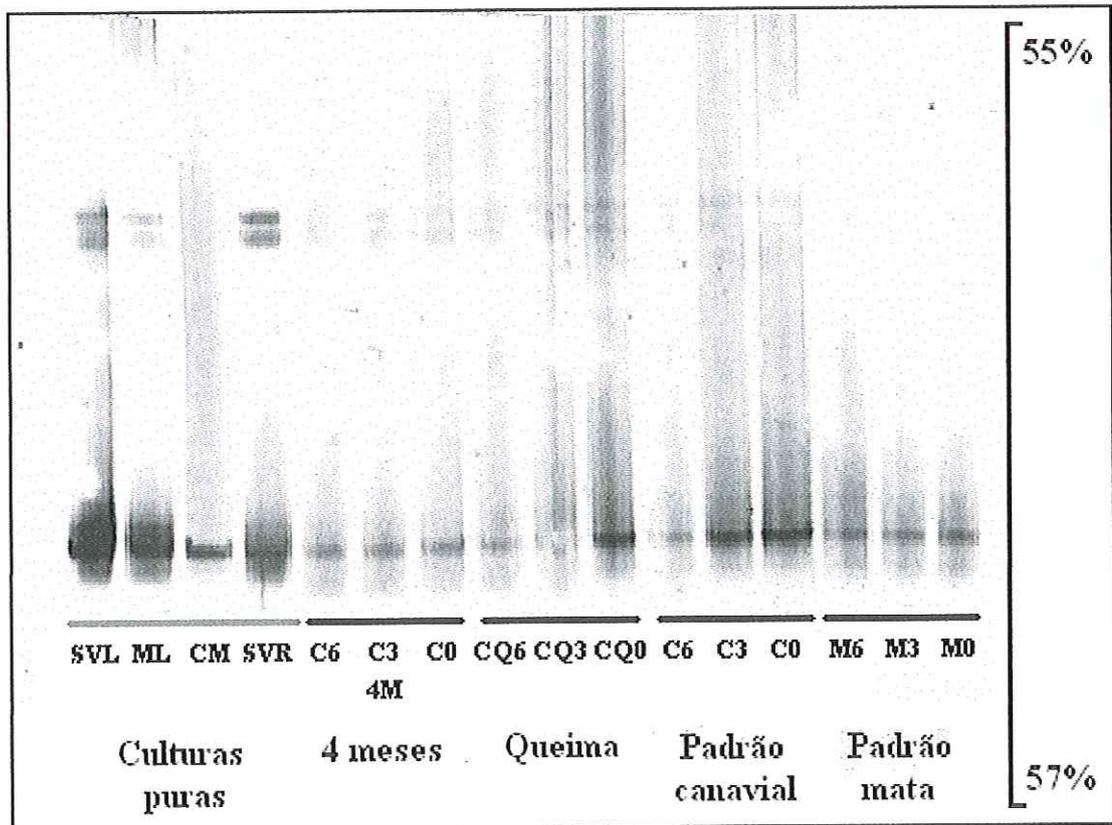
Depois de amplificadas as moléculas de DNA purificadas, todos os produtos das ampliações, tanto para o Domínio Bacteria quanto para o grupo dos actinomicetos, foram também aplicados em um gel de agarose 1% a fim de se ter uma confirmação positiva das ampliações (Figura 20).



**Figura 20.** Gel de agarose 1% com amostras de produto de PCR com primers do Domínio Bacteria e do grupo Actinomicetos. Da esquerda para a direita: DNA ladder, 5 bandas com produtos de amplificação do Domínio bactéria, **EC:** *Escherichia coli*, **LP:** *Lactobacillus plantarum*, **M0:** Solo de mata a 0 cm de profundidade. **M3:** Solo de mata a 3,0 cm de profundidade. **M6:** Solo de mata a 6,0 cm de profundidade, respectivamente; e 4 bandas com produtos de amplificação de actinomicetos, **SVL:** *Streptomyces violaceoruber*, **C0:** solo de cana a 0 cm de profundidade. **C3:** Solo de cana a 3,0 cm de profundidade. **C6:** Solo de cana a 6,0 cm de profundidade. Seguidas de outra amostra de DNA ladder. PB: número de pares de base.

Com todos os produtos de PCR prontos, foram feitas as eletroforeses em gel de DGGE. Os resultados obtidos com a amplificação por PCR do DNAr 16S, das populações de actinomicetos presentes no solo não foram positivos, como pode ser observado na Figura 20.

As regiões alvo, dos *primers* R513GC e F243, se mostraram conservadas. Quando aplicados os produtos das ampliações no gel de DGGE não ocorreram separações de bandas. Portanto, os dados encontrados indicam que o set de *primers* usados, para o grupo de actinomicetos, não foi adequado para a técnica DGGE, o que contradiz o proposto por HEUER *et al.* (1997), que conseguiram separação de bandas. A Figura 21 não é um resultado único, foram feitos diversos géis com diferentes concentrações de desnaturante e o resultado sempre foi o mesmo.



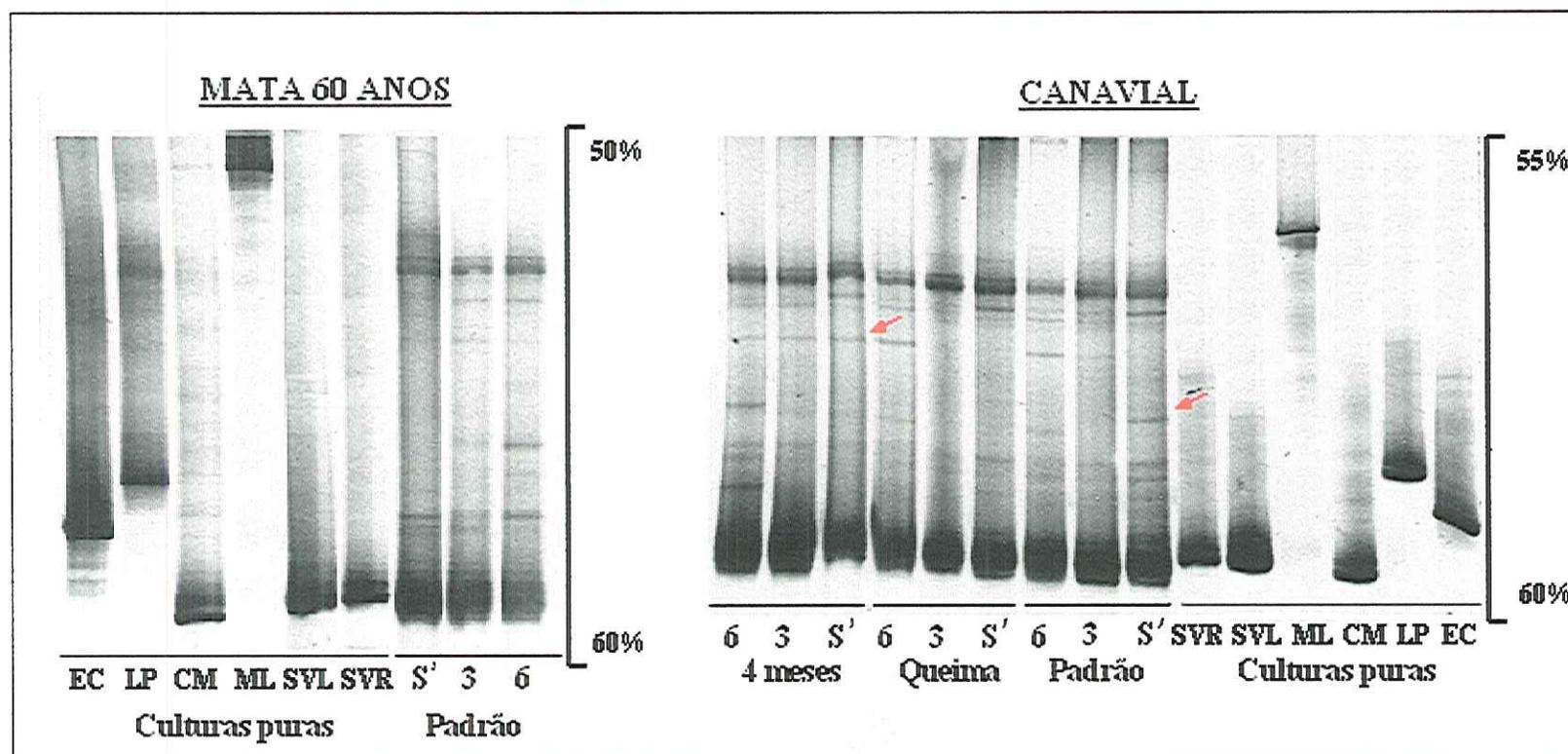
**Figura 21.** Gel de DGGE (55-57%) com amostras do solo de cana amplificando fragmento de actinomicetos. As amostras foram coletadas nos dias 27/11/1999 (amostras da mata e da cana antes e imediatamente depois da queima) e no dia 28/03/2000 (amostras de quatro meses). **CM:** *Clavibacter michigalensis*. **EC:** *Escherichia coli*. **LP:** *Lactobacillus plantarum*. **ML:** *Micrococcus luteus*. **SVL:** *Streptomyces violaceoruber*. **SVR:** *Streptomyces viridochromogenes*. **M0:** Solo de mata a 0 cm de profundidade. **M3:** Solo de mata a 3,0 cm de profundidade. **M6:** Solo de mata a 6,0 cm de profundidade. **C0:** solo de cana a 0 cm de profundidade. **C3:** Solo de cana a 3,0 cm de profundidade. **C6:** Solo de cana a 6,0 cm de profundidade. **CQ0:** Solo de cana queimada a 0 cm de profundidade. **CQ3:** Solo de cana queimada a 3,0 cm de profundidade. **CQ6:** Solo de cana queimada a 6,0 cm de profundidade. **4MC0:** Solo de cana quatro meses após a queima a 0 cm de profundidade. **4MC3:** Solo de cana quatro meses após a queima a 3,0 cm de profundidade. **4MC6:** Solo de cana quatro meses após a queima a 6,0 cm de profundidade.

A vegetação é o fator determinante na composição da comunidade microbiana do solo. Ela é a fonte primária de recursos para o crescimento de microorganismos heterotróficos do solo. Cada diferente espécie de planta é constituída de diferentes compostos de carbono, estes compostos, por sua vez, limitam o crescimento microbiano na medida que metabolismos específicos são necessários para degradá-los. Ainda, diferentes comunidades de plantas podem

alterar as características físicas e químicas do solo e favorecer o crescimento de espécies microbianas diferentes (NÜSSLEIN & TEIDJE, 1999).

Quanto às análises das bandas para as diferentes amostragens do solo de canavial, foram observadas duas bandas (setas vermelhas Figura 22), uma que está presente somente nas amostras da superfície do solo de canavial antes da queima e a outra que só é visualizada nas amostras da superfície de solo de canavial coletadas quatro meses após a queima. Estas bandas correspondem a populações bacterianas das amostras de solo retiradas da superfície do canavial e que, provavelmente devido à queima (que elevou a temperatura da superfície do solo a um pico de aproximadamente 90°C por aproximadamente quatro minutos), uma desaparece após a queima (eliminada pelo fogo) e a outra surge quatro meses após (ocupando, provavelmente, o novo nicho ecológico disponível). Todos os outros padrões de bandas (antes, imediatamente depois e quatro meses depois da queima nas profundidades de 3,0 e 6,0 cm) não sofreram alterações. Este fato confirma os dados mostrados na Figura 10, onde a temperatura do solo abaixo da superfície praticamente não se alterou. A prática da queima da cana-de-açúcar, neste caso, não causou modificações expressivas na estrutura da comunidade bacteriana do solo estudado.

O presente trabalho mostrou que existem diferenças entre solos próximos de mata e de canavial, e que a prática da queima do canavial, analisada segundo a técnica DGGE, não mostrou variações relevantes sobre a estrutura da comunidade microbiana do solo. A técnica DGGE, contribuiu como uma ferramenta de análise rápida da diversidade bacteriana nas amostras estudadas, porém sem identificar as populações bacterianas que compõe esta diversidade. Em estudos posteriores o uso de sondas específicas, para populações conhecidas das amostras, associadas a esta última técnica poderão trazer resultados mais conclusivos.



**Figura 22.** Fotos dos géis de DGGE com amostras de DNA para o Domínio Bactéria. As amostras foram coletadas nos dias 27/11/1999 (amostras da mata e da cana antes e imediatamente depois da queima) e no dia 28/03/2000 (amostras de quatro meses). Gel da esquerda (50%-60%) com amostras de DNA do solo da mata 60 anos. Gel da direita (55%-60%) com amostras de DNA do solo do canavial. CM: *Clavibacter michigalensis*. EC: *Escherichia coli*. LP: *Lactobacillus plantarum*. ML: *Micrococcus luteus*. SVL: *Streptomyces violaceoruber*. SVR: *Streptomyces viridochromogenes*. S': amostra de solo na superfície. 3: amostra de solo de 3,0cm de profundidade. 6: amostra de solo de 6,0cm de profundidade. Padrão: amostras colhidas antes da queima. Queima: amostras colhidas após a queima. 4 meses: amostras colhidas 4 meses após a queima. As setas vermelhas indicam bandas de S'-Padrão e de S'-4 meses que desaparecem e aparecem, respectivamente, nas outras amostragens.

## 6. CONCLUSÕES

- O solo se mostrou um bom isolante térmico e reduziu a ação do fogo apenas a superfície.
- Apesar da proximidade dos locais de amostragem, os solos de mata e do canavial diferem quanto a granulometria, provavelmente devido às alterações causadas pelo cultivo da cana.
- A queima do canavial, como um fato único, não provocou alterações bruscas nos teores de macro e micronutrientes do solo. Porém, um estudo a longo prazo dos mesmos parâmetros pode vir a mostrar problemas de fertilidade no solo principalmente quanto aos teores do elemento fósforo.
- A chuva não foi um fator de interferência na diversidade microbiana encontrada nas amostras pois coincidentemente elas foram coletadas em dias com as mesmas condições pluviométricas.
- A purificação do DNA extraído, uma etapa crítica do trabalho, só foi bem sucedida após o uso de duas colunas (“Wizard DNA Clean-Up System”) de purificação por amostra.
- As regiões alvo, dos *primers* R513GC e F243, se mostraram conservadas, de modo que este *set* de *primers* não se mostrou adequado para o estudo.
- O uso da técnica DGGE identificou o desaparecimento de uma população bacteriana somente na superfície de solo queimado. Sendo assim, a estrutura da

comunidade bacteriana do solo não sofreu modificações relevantes nas condições de estudo deste trabalho.

## 7. RECOMENDAÇÕES

- Serão necessários maiores estudos com a abordagem apresentada nessa Dissertação de Mestrado, dando ênfase a populações microbianas isoladas e identificadas do próprio local das amostragens como referência.
- Melhorar a eficiência da recuperação de DNA a partir das amostras de solo.
- Será necessário o desenho e a síntese de *primers* de regiões pouco conservadas para um grupo específico existente na amostra, afim de que sejam obtidos resultados mais substanciais a respeito da estrutura da comunidade em questão.
- Ampliar o período de estudo sobre a variação temporal e espacial da prática da queima de canaviais antes de seu corte, a fim de certificar o real impacto desse método sobre a microbiota do solo.
- Utilizar replicatas das amostras de solo de cada tratamento, para dar suporte estatístico ao estudo e eliminar a possibilidade de artefatos da técnica.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUJARO, R. (1979). *O uso da vinhaça na Usina Tamoio como fertilizante. Saccharum*, STAB, São Paulo, 2 (4): p. 23-27.
- ALEXANDER, M. (1961). *Introduction to Soil Microbiology*. John Wiley & Sons, Inc., New York and London.
- ALM, E. W.; STAHL, D. A. (1996). *Extraction of microbial DNA from aquatic sediments*. *Molecular Microbial Ecology Manual* (1.1.5): 1-29.
- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; KARL-HEINZ, S. (1995). *Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation*. *Microbiological Reviews* (59): 143-169.
- ARAÚJO, Q.R.; FIGUEIREDO, M.S.; COSTA, L.M.; LOURES, E.G.; REGUAZZI, A.J.; FONTES, L.E.F.; CASALI, V.W.D. (1995). *Atividade microbiana e fracionamento da matéria orgânica em um latossolo vermelho-amarelo variação una, submetido à queima e à percolação*. *Revista Ceres* (242): 391-404.
- ASSAD, E.D.; SANO, E.E.; MASUTOMO, R. (1993). *Veranicos nas regiões dos cerrados brasileiros, frequência e probabilidade de ocorrência*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, (28): 993-1003.

- BISSET, J; PARKINSON, D. (1980). *Long-term effects of the fire on the composition and activity of the soil microflora of a subalpine, coniferous forest*. Canadian Journal of Botanic (58): 1704-1721.
- BRÜGGEMANN, J.; STEPHEN, J.R.; CHANG, Y.J.; MACNAUGHTON, S.J.; KOWALCHUK, G.A.; KLINE, E.; WHITE, D.C. (2000). *Competitive PCR-DGGE Analysis of bacterial mixtures an internal standard and an appraisal of template enumeration accuracy*. Journal of Microbiological Methods (40): 111-123.
- CARDOSO, E.J.B.N; FREITAS, S.S. (1992). *A rizosfera*. In: Microbiologia do solo, capítulo 4. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Campinas.
- CARDOSO, E.J.B.N. (1992). *Efeito da matéria orgânica na biologia do solo*. Anais do Economia sobre matéria orgânica do solo. 203p. Botucatu, Faculdade de Ciências Agrárias. SP.
- CASARINI, D.C.P. (1989). *Efeito da fertirrigação com vinhaça nas propriedades químicas e microbiológicas do solo em um sistema de disposição de efluente industrial*. São Carlos, USP, Tese de Doutorado, 180 p.
- CERRI, C.C.; ANDREUX, F.; EDUARDO, B.P. (1992). *O ciclo do carbono no solo*. In: Microbiologia do solo, capítulo 4. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Campinas.
- CETESB. (1986). Legislação/CETESB. São Paulo.
- CETESB, COMPANHIA DE TECNOLOIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. (1988). *Avaliação do potencial poluidor da agroindústria sucro-alcooleira na 7º zona hidrográfica do estado de São Paulo*, 88 p.

- CETESB. (1993). *Caracterização da indústria canavieira*. In: A Cana de Açúcar e o Meio Ambiente no Estado de São Paulo. São Paulo, p. 11-12.
- CHANDLER, D.P.; SCHUCK, B.L.; BROCKMAN, F.J.; BRUCKNER-LEA, C.J. (1999). *Automated nucleic acid isolation and purification from soil extracts using renewable affinity microcolumns in a sequential injection system*. *Talanta* (49): 969-983.
- COUTINHO, L.M. (1982). *Ecological effect of fire in brazilian cerrado*. *Ecology of Tropical Savannas*, p. 273-291.
- CULLEN, D.W.; HIRSCH, P.R. (1998). *Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR*. *Soil Biology Biochemistry* (30): 983-993.
- CUSTÓDIO, H.B. (1995). *Legislação brasileira do estudo de impacto ambiental*. In: *Análise Ambiental: Uma visão multidisciplinar*, 2º ed, São Paulo, Editora da UNESP, p.45-64; Resolução CONAMA n.1/86.
- DIAS, I.F.O.; MIRANDA, A.C.; MIRANDA, H.S. (1996). *Efeitos de queimadas no microclima de solos de campos de cerrado – DF/Brasil*. *Anais do Simpósio Impacto das queimadas sobre os ecossistemas e mudanças globais*. p. 11-19, Brasília – DF, 6 a 11 de Outubro.
- DUARTE, G.F.; ROSADO, A.S.; SELDIN, L.; KEIJZER-WOLTERS, A.C.; ELSAS, J.D. (1998). *Extraction of ribosomal RNA and genomic DNA from soil for studying the diversity of the indigenous bacterial community*. *Journal of Microbiological Methods* (32): 21-29.
- ELSAS, J.D.; DUARTE, G.F., ROSADO, A.S., SMALLA, K. (1998). *Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial*

*inoculants and their effects in the soil environment*. Journal of Microbiological Methods (32): 133-154.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA) – CENTRO DE PESQUISA DE PECUÁRIA DO SUDESTE (CPPSE). (2000). *Análise do solo – unidades e interpretação – Programa de controle de qualidade de laboratórios com o sistema IAC de análise de solo*.

FATINATI, F.; MANFIO, G.P.; DESTÉFANO, S.L.; OLIVEIRA, V.M. (1999). *Métodos moleculares para a caracterização de diversidade microbiana*. Curso de treinamento oferecido de 4 a 8 de Outubro de 1999. Fundação André Tosello, Campinas-SP.

FELSKE, A.; ENGELN, B.; NÜBEL, U.; BACKHAUS, H. (1996). *Direct ribosome isolation from soil to extract bacterial rRNA for community analysis*. Applied and Environmental Microbiology (X): 4162-4167.

FERRI, M.J.; MUYZER, G.; WARD, D.M. (1996). *Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community*. Applied and Environmental Microbiology (62): 340-346.

FRITZE, HANNU; PENNANEN, T.; PIETIKAINEN, J. (1993). *Recovery of soil microbial biomass and activity from prescribed burning*. Canadian Journal of Forest Research. (23): 1286-1290.

GARCIA-OLIVA, F.; SANFORD Jr., R.L.; KELLY, E. (1999). *Effects of slash-and-burn management on soil aggregate organic C and N in a tropical deciduous forest*. Geoderma (88): 1-12.

GELSOMINO, A.; KEIJZER-WOLTERS, A.C.; CACCO, G.; VAN ELSAS, J.D. (1999). *Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase*

*chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. Journal of microbiological methods* (38): 1-15.

GLÓRIA, N.A; ORLANDO FILHO, J. (1984). *Aplicação de vinhaça: Um resumo e discussões sobre o que foi pesquisado. Parte 1. ÁLCOOL E AÇÚCAR*, São Paulo, (14): 24-35.

GLÓRIA, N.A; ORLANDO FILHO, J. (1984). *Aplicação de vinhaça: Um resumo e discussões sobre o que foi pesquisado. Parte 2. ÁLCOOL E AÇÚCAR*, São Paulo, (15): 22-27.

GLÓRIA, N.A; ORLANDO FILHO, J. (1984). *Aplicação de vinhaça: Um resumo e discussões sobre o que foi pesquisado. Parte 3. ÁLCOOL E AÇÚCAR*, São Paulo, (15): 32-39.

GOVERNO. <http://www.mre.gov.br/textos/brasilsint/industrial-n.htm>, 23/10/2000.

HEUER, H; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M.H. (1997). *Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. Applied and Environmental Microbiology* (63): 3233-3241.

HOLBEN, W.E.; JANSSON, J.K., CHELM, B.K., TIEDJE, J.M. (1998). *DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. Applied and Environmental Microbiology*, (54): 703-711.

HÖNERLAGE, W.; HAHN, D.; ZEYER, J. (1995). *Detection of mRNA of nprM in Bacillus megaterium ATCC 14581 grown in soil by whole-cell hybridization. Arch Microbial* (163): 235-241.

KING, R. C.; STANSFIELD, W. D. (1997). *A Dictionary of genetics*. Oxford University Press.

KIRCHHOFF, V. W. J. H. (1991). *As queimadas da cana*. Transtec Editorial.

KOWALCHUK, G.A.; STEPHEN, J.R.; BOER, W.; PROSSER, J.I.; EMBLEY, T.M.; WOLDENDORP, J.W. (1997). *Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the  $\beta$  subdivision of the class proteobacter in coastal sand by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16s ribosomal and fragments*. Applied and Environmental Microbiology (63): 1489-1497.

KRSEK, M; WELLINGTON, E.M.H. (1999). *Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil*. Journal of Microbiological Methods (39): 1-16.

LAURE, C. J. (1991). *Efeitos de queimadas sobre a atmosfera: produção de gases nocivos*. Workshop "Queima da cana", Inpe, São José dos Campos, p.27-28, Março.

LOPES. (1978), A.S. *Manual de fertilidade do sol*. ESAL, Lavras, MG.

MACHADO, P.A.L. (1998). *Direito ambiental brasileiro*. Malheiros Editores LTDA.

MACNAUGHTON, S.J.; STEPHEN, J.R.; VENOSA, A.D.; DAVIS, G.A.; CHANG, Y.; WITHE, D.C. (1999). *Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill*. Applied and Environmental Microbiology (65): 3566-3574.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. (1997). *Brock biology of microorganisms*. Prentice Hall, Inc.

MANFIO, G.P. *Microrganismos e aplicações industriais*. Base de Dados Tropical, [www.bdt.org.br](http://www.bdt.org.br), 23/10/2000.

MANUAL GLOBAL DE ECOLOGIA. (1996). 2º Edição brasileira. Editora Augustus, São Paulo-SP.

MARINHO, E. V. <sup>a</sup> (1991). *Projeto fogo*. Journal of atmospheric chemistry (12): 87-102.

MELLO, R. (1997). *Custos ambientais de agroecossistemas da cana de açúcar*. São Carlos. 202p. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

MILLER, M.; PALOJÄRVI, A.; RANGGER, A.; REESLEV, M.; KJOLLER, A. (1998). *The use of fluorogenic substrates to measure fungal presence and activity in soil*. Applied and Environmental Microbiology (64): 613-617.

MORAES, J.M. *Postos pluviométricos*.  
<http://www.cena.usp.br/piracena/html/postos.htm>, 12/01/2001.

MURRAY, A.E.; HOLLIBAUGH, J.T.; ORREGO, C. (1996). *phylogenetic compositions of bacterioplankton from two california estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments*. Applied and Environmental Microbiology (62): 2676-2680.

MUYZER, G.; WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. (1993). *Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA*. Applied and Environmental Microbiology (59): 695-700.

- MUYZER, G.; HOTTENTRÄGER, S.; TESKE, A.; WAWER, C. (1996). *Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA – A new molecular approach to analyze the genetic diversity of mixed microbial communities*. Molecular Microbial Ecology Manual (3.4.4): 1-23.
- NEARY, D.G. KLOPATEK, C.C.; DEBANO, L.F.; FFOLIOTT, P.F. (1999). *Fire effects on belowground sustainability: a review and synthesis*. Forest ecology and management (122), p.51-71.
- NEVES, M.C.P.; LIMA, I.T.; DOBEREINER, J. (1983). *Efeito da vinhaça sobre a microflora do solo*. Revista Brasileira de Ciência do Solo, (7): 131-136.
- NEVES, M.C.P. (1992). *Como os microorganismos do solo obtêm energia e nutrientes*. In: Microbiologia do solo, capítulo 2. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Campinas.
- NEVES, B.M.; MIRANDA, H.S. (1996). *Efeitos do fogo no regime térmico do solo de um campo sujo de cerrado*. Anais do Simpósio Impacto das queimadas sobre os ecossistemas e mudanças globais. p. 20-30, Brasília – DF, 6 a 11 de Outubro.
- NICKELL, L.G. (1970). *Comparisons of burning Vs. Non-burning of cane I Filo*. Annual conference hawaiian sugar technologists. Reports, p.101-110.
- NINER, B.M.; BRANDT, J.P.; VILLEGAS, M.; MARSHALL, C.R.; HIRSCH, A.N.; VALDÉS, M. (1996). *Analysis of partial sequences of genes coding for 16S rRNA of actinomycetes isolated from casuarina equisetifolia nodules in Mexico*. Applied and Environmental Microbiology (62): 3034-3036.
- NÜSLEIN, K.; TIEDJE, J.M. (1999). *Soil bacterial community shift correlated with change from forest to pasture vegetation in a tropical soil*. Applied and Environmental Microbiology (65): 3622-3626.

ODUM, E. P. (1993). *Ecologia*. Editora Guanabara Koogan S.A.

OLIVEIRA, M.E. (1994). *Efeitos do fogo sobre o solo*. Floresta e Ambiente (01): 142-145.

OLIVEIRA, V.M. (1999). *Diversidade genética de rizóbios em amostras ambientais analisada através do uso de sondas moleculares e primers específicos*. Campinas. 136p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

ORLANDO FILHO, J.; BITTENCOURT, V.C.; ALVES, M.C. (1995). *Aplicação de vinhaça em solo arenoso do Brasil e poluição do lençol freático com nitrogênio*. Stab (13): 14-16.

ORLANDO FILHO, J.; SOUZA, I.C. DE; ZAMBELLO Jr. (1980)., E. *Aplicação de vinhaça em soqueiras de cana-de-açúcar; economicidade do sistema caminhões-tanque*. Boletim técnico Planalsucar, Piracicaba, (2): 5-35.

PAULA JÚNIOR, D.R. (1995). de. *Impacto ambiental da agroindústria: tecnologias para controle de resíduos*. In: *Análise de Impacto Ambiental - estratégias e ações*. p. 248-252. São Paulo: Fundação Salim Farah Maluf.

PEREIRA, M.G.; GAVA, C.A.T.; NEVES, M.C.P.; PEREIRA, J.C. (1998). *Interação entre actinomicetos e rizóbio na rizosfera de soja (Glycine max (L.) Merrill) cv. Serido*. Resumos. Lavras: UFLA / SBCS / SBM, p.610.

PEREIRA, J.C.; NEVES, M.C.P.; GAVA, C.A.T. (2000). *Efeito do cultivo da soja na dinâmica da população bacteriana, em solos de Cerrado*. Pesquisa Agropecuária Brasileira. Brasília.

- REYSENBACH, A.; GIVER, L. J.; WICKHAM, G. S.; PACE, N. R. (1992). *Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction*. Applied and Environmental Microbiology (58): 3417-3418.
- RÖLLEKE, S.; GURTNER, C., DREWELLO, U., DREWELLO, R.; LUBITZ, W.; WEISSMANN, R. (1999). *Analysis of bacterial communities on historical glass by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA*. Journal of Microbiological Methods (36): 107-114.
- ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F.; SELDIN, L.; ELSAS, J.D. (1997). *Molecular microbial ecology: a minireview*. Revista de Microbiologia (28): 135-147.
- SHAFER, S. R.; HEAGLE, S. R.; CAMBERATO, D. M. (1987). *Effects of chronic doses of ozone in field-grown loblolly pine: seedling responses in the first year*. Journal Air Pollut, (37), 1179-1184.
- SILVA, D.; WITTEWER, C.T. (2000). *Monitoring hybridization during polymerase chain reaction*. Journal of Chromatography B. (741): 3-13.
- SILVA, M.S.L.; RIBEIRO, M.R. (1995). *Influência do cultivo contínuo da cana-de-açúcar nas propriedades químicas de solos argilosos*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, (30): 389-394.
- SMALLA, K.; Van OVERBEEK, L.S.; Van ELSAS, J.D. (1993). *Prevalence of nptII in kanamycin resistant bacteria from different environments*. Fems Microbial Ecology, (13): 47-58.
- STEPHEN, J.R.; McCAIG, A.E.; SMITH, Z.; PROSSER, J.I.; EMBLRY, T.M. (1996). *Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to  $\beta$ -subgroup ammonia-oxidizing bacteria*. Applied and Environmental Microbiology (62): 4147-4154.

- SZMRECSÁNYI, T. (1994). *Tecnologia e degradação ambiental: O caso da agroindústria canavieira no estado de São Paulo*. *Informações Econômicas*. (24): 73-81.
- TATE III, R.L. (1995). *Soil Microbiology*. John Wiley & Sons, Inc.
- TESKE, A.; SIGALEVICH, P.; COHEN, Y.; MUYZER, G. (1996). *Molecular identification of bacteria from a coculture by denaturing gradient gel electrophoresis of 16s ribosomal DNA fragments as a tool for isolation in pure cultures*. *Applied and Environmental Microbiology* (62): 4210-4215.
- TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F. L. (1990). *High diversity in DNA of soil bacteria*. *Applied and Environmental Microbiology* (56): 782-787.
- TORSVIK, V.; DAAE, F.L.; SANDAA, R.; OVREAS, L. (1998). *Novel techniques for analyzing microbial diversity in natural and perturbed environments*. *Journal of Biotechnology* (64): 53-62.
- TSAI, S.M.; BARAIBAR, A.V.L.; ROMANI, V.L.M. (1992). *Efeito de fatores do solo*. In: *Microbiologia do solo*, capítulo 4. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Campinas.
- TSAI, Y.; OLSON, B. H. (1991). *Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments*. *Applied and Environmental Microbiology* (57): 1070-1074.
- VASCONCELLOS, C.A.; SANTANA, D.P.; FERREIRA, L. (1994). *Métodos de determinação da necessidade de calagem e características físico-químicas de alguns solos de Minas Gerais*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, (29): 1253-1263.

- VAZOLLER, R.F. (1995). *Avaliação do ecossistema microbiano de um biodigestor anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, operado com vinhaça sob condições termofílicas*. São Carlos. 259p. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- VOLOSSIOUK, T.; ROBB J.; NAZAR, R.N. (1995). *Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms*. *Applied and Environmental Microbiology* (61): 3972-3976.
- ZAMPERLINI, G. C. M. (1997). *Investigação da fuligem proveniente da queima de cana-de-açúcar com ênfase nos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)*. Araraquara-SP: UNESP, Instituto de Química de Araraquara, Departamento de Química Analítica.
- ZHOU, J.; BRUNS, M.A.; TIEDJE, J.M. (1996). *DNA Recovery from soils of diverse composition*. *Applied and Environmental Microbiology* (62): 316-322.
- WARD, D. M.; BATESON, M. M.; WELLER, R.; RUFF-ROBERTS, A. L. (1992). *Ribosomal RNA Analysis of microorganisms as they occur in nature*. *Advances in Microbial Ecology*, Vol. 12, edited by K. C. Marshall. Plenum Press, New York.
- WHITE, D.C.; FLEMMING, C.A.; LEUNG, K.T.; MACNAUGHTON, S.J. (1998). *In situ microbial ecology for quantitative appraisal, monitoring, and risk assessment of pollution remediation in soil, the subsurface, the rhizosphere and in biofilms*. *Journal of Microbiological Methods* (32): 93-105.



**APÊNDICE**



## LABORATÓRIO DE SOLOS RESULTADOS DE ANÁLISES

SOLICITANTE : EDUARDO B. M. CATTONY  
PRODUTOR : O MESMO  
PROPRIEDADE : EESC - USP  
DATA DA COLETA : 24/08/2000

PROJETO : PARTICULAR  
Nº REQUISIÇÃO : 00/269  
Nº DE ARQUIVO : 2000-269  
DATA DA ENTREGA DO RESULTADO : 10/09/2000

| Nº Lab. | Identificação | pH<br>H <sub>2</sub> O | pH<br>CaCl <sub>2</sub> | M.O<br>g/dm <sup>3</sup> | P                            | K   | Ca  | Mg | H+Al | Al | CTC | S   | V<br>% | m<br>% | (Ca+Mg)<br>K |
|---------|---------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------------|-----|-----|----|------|----|-----|-----|--------|--------|--------------|
|         |               |                        |                         |                          | RESINA<br>mg/dm <sup>3</sup> |     |     |    |      |    |     |     |        |        |              |
| 00/2325 | cana          | 7,3                    | 7,1                     | 55                       | 189                          | 8,5 | 592 | 42 | 11   | 0  | 654 | 642 | 98     | 0      | 75           |
| 00/2326 | mata          | 5,0                    | 4,4                     | 59                       | 45                           | 3,8 | 22  | 10 | 80   | 8  | 115 | 36  | 31     | 18     | 8            |

| Nº Lab. | Identificação | Areia total | Argila | Silte |
|---------|---------------|-------------|--------|-------|
|         |               | g/kg        | g/kg   | g/kg  |
| 00/2325 | cana          | 150         | 372    | 478   |
| 00/2326 | mata          | 284         | 525    | 191   |

| Nº Lab. | Identificação | Cu    | Fe    | Zn    | Mn    |
|---------|---------------|-------|-------|-------|-------|
|         |               | mg/kg | mg/kg | mg/kg | mg/kg |
| 00/2325 | cana          | 3,1   | 41    | 5,3   | 27,8  |
| 00/2326 | mata          | 10,5  | 117   | 2,8   | 70,3  |

  
GILBERTO BATISTA DE SOUZA  
CRQ - IV - N. 0090030

Ministério da Agricultura  
e do Abastecimento

Empresa Brasileira  
de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Pecuária Sudeste

Rodovia Washington Luiz, km 234  
Fazenda Canchim - CP 339  
13560-970- São Carlos- SP

Telefone (016) 261 5611  
FAX (016) 261 5754  
E-mai: lgilberto@cnpse.embrapa.br>



LABORATÓRIO DE SOLOS  
RESULTADOS DE ANÁLISES

SOLICITANTE : EDUARDO B. M. CATTONY  
PRODUTOR : EESC - USP  
PROPRIEDADE :  
DATA DA COLETA : 02/10/00

PROJETO : PARTICULAR  
Nº REQUISIÇÃO : 330/00  
Nº DE ARQUIVO : 2000-330.DOC  
DATA DA ENTREGA DO RESULTADO : 19/10/00

| Nº Lab. | Identificação             | pH<br>H <sub>2</sub> O | pH<br>CaCl <sub>2</sub> | M.O<br>g/dm <sup>3</sup> | P<br>RESINA<br>mg/dm <sup>3</sup> | K   | Ca | Mg | H+Al | Al | CTC | S  | V<br>% | m<br>% | (Ca+Mg)<br>K |
|---------|---------------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|-----------------------------------|-----|----|----|------|----|-----|----|--------|--------|--------------|
|         |                           |                        |                         |                          |                                   |     |    |    |      |    |     |    |        |        |              |
| 00/2518 | AM 01 - CANA<br>QUEIMADA  | 7,0                    | 7,2                     | 40                       | 19                                | 0,6 | 22 | 7  | 40   | 0  | 69  | 30 | 43     | 0      | 49           |
| 00/2519 | AM 02 - 4 MESES<br>DEPOIS | 6,2                    | 6,2                     | 38                       | 13                                | 0,5 | 22 | 7  | 38   | 0  | 68  | 30 | 44     | 0      | 56           |

| Nº Lab. | Identificação             | Cu<br>mg/dcm3 | Fe<br>mg/dcm3 | Zn<br>mg/dcm3 | Mn<br>mg/dcm3 |
|---------|---------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|         |                           |               |               |               |               |
| 00/2518 | AM 01 - CANA<br>QUEIMADA  | 3,8           | 16            | 0,7           | 25,8          |
| 00/2519 | AM 02 - 4 MESES<br>DEPOIS | 3,7           | 15            | 0,6           | 22,3          |

  
GILBERTO BATISTA DE SOUZA  
ORQ - IV - N. 0090030