

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS  
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS MOLECULARES

**Avaliação da Diversidade Metabólica de  
Micro-organismos de Solo do Cerrado Goiano Após  
Cultivo de Cana-de-Açúcar**

**Marcos Antonio Pereira Júnior**

Orientador: Prof. Dr. Flavio Marques Lopes

Co-orientadora: Prof. Dra. Kátia Flávia Fernandes

ANÁPOLIS

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS  
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS MOLECULARES

**MARCOS ANTONIO PEREIRA JÚNIOR**

**Avaliação da Diversidade Metabólica de  
Micro-organismos de Solo do Cerrado Goiano Após  
Cultivo de Cana-de-Açúcar**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Moleculares, área de concentração Química Orgânica da Universidade Estadual de Goiás, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares.

ANÁPOLIS

2013



Dedico este trabalho em especial aos meus Pais, que tanto me apoiaram nessa caminhada e que sempre estiveram presente na realização desse desafio.

Meus familiares;

A família LQP e amigos.

**Pesquisar e ver**

**o que todos vêem**

**e pensar**

**o que ninguém pensou.**

**Albert Von Szent-Györgyi Nagyrápolt**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, pela determinação e coragem.

Agradeço meus pais Marcos e Marly por terem me ensinado o caminho a seguir e pelo seu amor incondicional e incentivo, as minhas irmãs Bruna e Tais, aos meus avós e a toda minha família.

Agradeço aos que me deram a oportunidade de chegar até aqui, meus orientadores Flávio Marques, Kátia Flávia e Karla, aos professores Cláudia, Cirano, Paulo e Valdirene. Aqueles que me apoiaram quando mais precisei e aqueles que me deram forças para prosseguir.

Agradeço aos colegas de Laboratório: Maurício, Caroline, Luíza, Aline, Ariadne, Bruna, Maria Carolina, Beatriz e Wendel pela ajuda, apoio e descontração.

Agradeço aos meus amigos Edgar, Rogério, Marco Túlio, Antonia, Wilker, Camila, e Aline.

Agradeço a todos pela realização deste trabalho.

Obrigado!!!

## RESUMO

### **Avaliação da Diversidade Metabólica de Micro-organismos de Solo do Cerrado Goiano Após Cultivo de Cana-de-Açúcar**

A qualidade do solo é um parâmetro que avalia a capacidade específica de uma determinada classe de solo, observando sua funcionalidade dentro de limites de um ecossistema natural ou manejado, sustentando a produtividade biológica. A qualidade do solo hoje, não é mais vista apenas como um solo com boa fertilidade, mais também com uma boa estruturação e que contenha uma grande diversidade de macro e micro-organismos. As características microbianas do solo estão sendo cada vez mais avaliadas como indicadores sensíveis da saúde e qualidade do solo. O presente estudo teve como objetivo avaliar a comunidade microbiana de solo de cerrado nativo e compará-la à comunidade microbiana de áreas de cultivo de cana-de-açúcar em manejo convencional e orgânico. Para isso foram coletadas amostras de solo sob manejo convencional e orgânico e amostras de solo sob vegetação nativa do cerrado em duas Usinas Alcooleiras no estado de Goiás, o número de micro-organismos do solo foi quantificado pelo número de UFC  $g^{-1}$  de solo, o perfil metabólico foi determinado utilizando Biolog Ecoplate e a prospecção da comunidade microbiana do solo nativo da Usina Goiasa foi realizada em biorreatores contendo meio MN e MN+JE para produção de massa celular. Os biorreatores foram tamponados com  $K_2PO_4$ ,  $MgCO_3$ , NaOH,  $Na_2CO_3$  e KOH para controle do pH. A diversidade metabólica dos biorreatores contendo os MN+JE e MN+JE+ $MgCO_3$  foi determinada utilizando Biolog Ecoplate e a análise dos dados foram realizadas utilizando o teste de *Tukey* e Análise de Componentes Principais (PCA). O solo sob manejo orgânico apresentou o maior número de UFC  $g^{-1}$  de solo, na avaliação da degradação dos substratos presente no Biolog frente o tempo, verificou-se que a avaliação dos dados deveria ser realizada com o tempo máximo de 120 h de incubação. Na metabolização das fontes de C a comunidade do solo da Usina Goiasa apresentou uma maior uniformidade na metabolização. Na análise de componentes principais a amostra de solo nativo da Usina Jalles foi determinado como PC1 em 5 dos 6 grupos testados. Na avaliação dos meios de cultura para produção de massa célula percebeu-se que a maior produção foi frente ao meio MN+JE. Os tampões  $K_2PO_4$ ,  $MgCO_3$ , NaOH,  $Na_2CO_3$  e KOH não foram eficientes no controle do pH dos biorreatores. No entanto, na valiação da diversidade metabólica da comunidade microbiana crescida em biorreator com meio MN+JE e MN+JE+ $MgCO_3$  o biorreator suplementado com  $MgCO_3$  apresentou a capacidade de metabolizar um maior número de fontes de carbono. Frente aos resultados encontrados foi observado que o método Biolog EcoPlate se mostrou sensível para a avaliação da diversidade metabólica das comunidades microbianas de solo estudadas e das comunidades crescidas em biorreatores.

Palavras-chave: Biolog; biorreator; PCA ; solo nativo; UFC

## ABSTRACT

### **Evaluation of Metabolic Diversity of Soil Microorganisms of Savanna Goiane After Cultivation of Sugar Cane**

Soil quality is a parameter that evaluates the specific capacity of a particular soil class, noting its functionality within limits of a natural or managed ecosystem, sustaining biological productivity. Soil quality today is no longer seen only as a soil with good fertility, most also with a good structure and contains a wide range of macro and micro-organisms. The soil microbial characteristics are being increasingly evaluated as sensitive indicators of health and soil quality. The present study aimed to evaluate the microbial community of native savanna soil and compare it to the microbial community growing areas of sugar cane in conventional and organic management. For this, samples of soil under conventional and organic management and soil sample under native savanna vegetation in two plants in the state of Goiás, the number of soil microorganisms was determined by CFU g<sup>-1</sup> soil, the metabolic profile was determined using Biolog Ecoplate and prospecting the soil microbial community native plant Goiasa was performed in bioreactors containing medium MN and MN + JE for the production of cell mass. The bioreactors were buffered with K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgCO<sub>3</sub>, NaOH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and KOH for pH control. The metabolic diversity of bioreactors containing MN and MN+JE and MN+JE+MgCO<sub>3</sub> was determined using Biolog Ecoplate and data analysis were performed using the Tukey test and Analysis Principal Component (APC). The soil under organic management had the highest number of CFU g<sup>-1</sup> soil. In the evaluation of the degradation of substrates present in front Biolog time, it was found that the data evaluation should be performed with the maximum time of 120 h of incubation. In the metabolism of C sources Community Plant Goiasa soil had a greater uniformity in metabolism. In principal component analysis the soil sample Native Plant Jalles was determined as PC1 in 5 of the 6 groups tested. In the evaluation of culture media for cell mass production was noticed that the highest production was observed in medium MN+JE. Caps K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgCO<sub>3</sub>, NaOH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and KOH were not effective in controlling the pH of the bioreactor. However in Evaluating the metabolic diversity of the microbial community grown in a bioreactor with medium MN and MN+JE and MN+JE+MgCO<sub>3</sub> the bioreactor supplemented with MgCO<sub>3</sub> showed the ability to metabolize a greater number of carbon sources. The observed results it was observed that the method Biolog Ecoplate was sensitive for the evaluation of metabolic diversity of soil microbial communities studied and communities grown in bioreactors.

Keywords: Biolog; bioreactor; APC; native soil; CFU

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema do biorreator para crescimento da comunidade microbiana do solo da usina Goiasa.....30
- Figura 2. Determinação da UFC g<sup>-1</sup> de solo, em solos sob manejo orgânico e convencional e solo nativo nas Usina Jalles Machado (A) e Usina Goiasa (B). Letras iguais não se diferem estatisticamente.....37
- Figura 3 - Avaliação das características dinâmicas da capacidade de utilização das fontes de carbono pela comunidade microbiana do solo nativo da Usina Jalles Machado (NAT-J), no período de 120h de incubação a ± 25°C em placa BIOLOG EcoPlate. Dados representados com média e desvio padrão em leitura a 595 nm. .40
- Figura 4 - Desenvolvimento da cor, durante um período de incubação de 120 horas (±25°C) da amostra do solo nativo da Usina Jalles Machado em microplacas Biolog EcoPlate. Fontes de carbono: A2- β-Metil-D-Glicosídeo (carboidrato), D2- D-Manitol (carboidrato), B3- Ácido D-Galacturônico (ácido carboxílico), B4- L-Asparagina (aminoácido), H1 α-D-Lactose (carboidrato) e C2- i-Eritritol (carboidrato), leituras da placa realizadas a 595 nm.....42
- Figura 5. Perfil de metabolização de polímeros. Usina Jalles Machado A, Usina Goiasa B. Fontes de Carbono C1- Tween 40, D1- Tween 80, E1- α-ciclodextrina e F1-Glicogênio. Letras iguais não se diferem estatisticamente. ....45
- Figura 6. Perfil da metabolização de Carboidratos. Usina Jalles Machado - A, Usina Goiasa -B. Fontes de carbono A2- β-Metil-D-Glicosídeo, B2- D-Xilose, C2-i-Eritritol, D2- D-Manitol, E2- N-Acetil-D-Glicosamína, G1- D-celobiose e H1 α-D-Lactose. Letras iguais não se diferem estatisticamente.....50
- Figura 7. Perfil de metabolização dos Ácidos Carboxílicos. Usina Jalles Machado - A, Usina Goiasa -B. Fontes de Carbono A3- Ácido D-Galactorônico γ-Lactona, B3- Ácido D-Galacturônico, C3- Ácido 2-hidroxibenzóico, D3- Ácido 4-hidroxibenzóico, E3- Ácido γ-Hidroxibutírico, F2- Ácido D-Glicosamínico, F3- Ácido Itacônico, G3- Ácido α-Cetobutírico e H3- Ácido D-Málico. Letras iguais não se diferem estatisticamente. ....54
- Figura 8. Perfil de metabolização de aminoácidos. Usina Jalles Machado - A, Usina Goiasa -B. Fontes de Carbono A4- L-Arginina, B4- L-Asparagina, C4- L-Fenilalanina, D4- L-Serina, E4-L-Treonina, F4- Ácido Glicil-L-Glutâmico. Letras iguais não se diferem estatisticamente.....57
- Figura 9. Perfil de metabolização de Amina/Amida. Usina Jalles Machado - A, Usina Goiasa -B. Fontes de Carbono G4- Feniletilamina e H4- Putrescina. Letras iguais não se diferem estatisticamente. ....60
- Figura 10. Perfil de metabolização de Miscelânias. Usina Jalles Machado - A, Usina Goiasa -B. Fontes de Carbono B1- Éster metílico do ácido pirúvico, G2- Glicose-1-

fosfato e H2- D,L- $\alpha$ -Glicerol Fosfato. Letras iguais não se diferem estatisticamente. .....	61
Figura 11 - Polímeros: gráfico da PCA com primeiro e segundo componente principal das amostras NAT-G (solo nativo da Usina Goiasa), CONV-G (solo convencional da Usina Goiasa), NAT-J (solo nativo da Usina Jalles), ORG-J (solo orgânico da Usina Jalles) e CONV-J (solo convencional da Usina Jalles) baseados nos valores de absorvância do Biolog EcoPlate.....	64
Figura 12 – Polímeros: PCA dos dois primeiros componentes principais para as fontes C1- Tween 40, D1- Tween 80, E1- $\alpha$ -ciclodextrina e F1-Glicogênio, com base nos valores de absorvância do Biolog EcoPlate. ....	66
Figura 13 - Carboidratos: gráfico da PCA com primeiro e segundo componente principal das amostras NAT-G (solo nativo da Usina Goiasa), CONV-G (solo convencional da Usina Goiasa), NAT-J (solo nativo da Usina Jalles), ORG-J (solo orgânico da Usina Jalles) e CONV-J (solo convencional da Usina Jalles) baseados nos valores de absorvância do Biolog EcoPlate. ....	67
Figura 14 - Carboidratos: PCA dos dois primeiros componentes principais para as fontes A2- $\beta$ -Metil-D-Glicosídeo, B2- D-Xilose, C2-i-Eritritol, D2- D-Manitol, E2- N-Acetil-D-Glicosamína, G1- D-celobiose e H1 $\alpha$ -D-Lactose, com base nos valores de absorvância do Biolog EcoPlate.....	68
Figura 15 - Ácidos Carboxílicos: gráfico da PCA com primeiro e segundo componente principal das amostras NAT-G (solo nativo da Usina Goiasa), CONV-G (solo convencional da Usina Goiasa), NAT-J (solo nativo da Usina Jalles), ORG-J (solo orgânico da Usina Jalles) e CONV-J (solo convencional da Usina Jalles) baseados nos valores de absorvância do Biolog EcoPlate.....	70
Figura 16 – Ácidos Carboxílicos: PCA dos dois primeiros componentes principais para as fontes, A3- Ácido D-Galactorônico $\gamma$ -Lactona, B3- Ácido D-Galacturônico, C3- Ácido 2-hidroxibenzóico, D3- Ácido 4-hidroxibenzóico, E3- Ácido $\gamma$ -Hidroxibutírico, F2- Ácido D-Glicosamínico, F3- Ácido Itacônico, G3- Ácido $\alpha$ -Cetobutírico e H3- Ácido D-Málico, com base nos valores de absorvância do Biolog EcoPlate.....	71
Figura 17 - Aminoácidos: gráfico da PCA com primeiro e segundo componente principal das amostras NAT-G (solo nativo da Usina Goiasa), CONV-G (solo convencional da Usina Goiasa), NAT-J (solo nativo da Usina Jalles), ORG-J (solo orgânico da Usina Jalles) e CONV-J (solo convencional da Usina Jalles) baseados nos valores de absorvância do Biolog EcoPlate. ....	72
Figura 18 - Aminoácidos: PCA dos dois primeiros componentes principais para as fontes A4- L-Arginina, B4- L-Asparagina, C4- L-Fenilalanina, D4- L-Serina, E4-L-Treonina, F4- Ácido Glicil-L-Glutâmico, com base nos valores de absorvância do Biolog EcoPlate.....	73

Figura 19 - Amina/Amida: gráfico da PCA com primeiro e segundo componente principal das amostras NAT-G (solo nativo da Usina Goiás), CONV-G (solo convencional da Usina Goiás), NAT-J (solo nativo da Usina Jalles), ORG-J (solo orgânico da Usina Jalles) e CONV-J (solo convencional da Usina Jalles) baseados nos valores de absorvância do Biolog EcoPlate. ....	74
Figura 20 – Amina/Amida: PCA dos dois primeiros componentes principais para as fontes G4-Feniletilamina e H4-Putrescina, com base nos valores de absorvância do Biolog EcoPlate. ....	75
Figura 21 - Miscelâneas: gráfico da PCA com primeiro e segundo componente principal das amostras NAT-G (solo nativo da Usina Goiás), CONV-G (solo convencional da Usina Goiás), NAT-J (solo nativo da Usina Jalles), ORG-J (solo orgânico da Usina Jalles) e CONV-J (solo convencional da Usina Jalles) baseados nos valores de absorvância do Biolog EcoPlate. ....	76
Figura 22 - Miscelâneas: PCA dos dois primeiros componentes principais para as fontes B1- Éster metílico do ácido pirúvico, G2- Glicose-1-fosfato e H2- D,L- $\alpha$ -Glicerol Fosfato, com base nos valores de absorvância do Biolog EcoPlate. ....	78
Figura 23. Cinética de crescimento da comunidade microbiana do solo nativo da Usina Goiás em tres diferentes meio de cultura: MN, MN+JE e JE+G, no período de 72 horas. ....	81
Figura 24. Consumo de glicose durante o crescimento da comunidade microbiana do solo nativo da Usina Goiás em três diferentes meios de cultura: MN, MN+JE e JE+G, no período de 72 horas. ....	82
Figura 25. Avaliação do pH durante a cínética de crescimento da comunidade microbiana do solo nativo da Usina Goiás em três diferentes meios de cultura: MN, MN+JE e JE+G, no período de 72 horas.....	83
Figura 26. Cinética de crescimento da comunidade microbiana do solo nativo da Usina Goiás nos meios de cultura MN+JE e MN+JE suplementado com tampão $K_2HPO_4$ no período de 72 horas.....	84
Figura 27. Consumo de glicose durante o crescimento da comunidade microbiana do solo nativo da Usina Goiás nos meios de cultura MN+JE e MN+JE (T) suplementado com tampao $K_2HPO_4$ no período de 72 horas.....	84
Figura 28. Avaliação do pH da cinética de crescimento da comunidade microbiana do solo nativo da Usina Goiás nos meios de cultura MN+JE e MN+JE (T) suplementado com tampao $K_2HPO_4$ no período de 72 horas.....	85
Figura 29. Cinética de crescimento da comunidade microbiana do solo nativo da Usina Goiás utilizando meio de cultura MN+JE suplementado com tampão $MgCO_3$ , NaOH, $Na_2CO_3$ e KOH no período de 72 horas.....	86

Figura 30. Consumo de glicose durante o crescimento da comunidade microbiana do solo nativo da Usina Goiasa utilizando meio de cultura MN+JE suplementado com tampão $MgCO_3$ , NaOH, $Na_2CO_3$ e KOH no período de 72 horas.....	86
Figura 31. Avaliação do pH da cinética de crescimento da comunidade microbiana do solo nativo da Usina Goiasa, utilizando meio de cultura MN+JE suplementado com tampão $MgCO_3$ , NaOH, $Na_2CO_3$ e KOH no período de 72 horas. ....	87
Figura 32 – Comunidade do solo Nativo da Usina Goiasa e dos Biorreatores MN+JE e MN+JE+ $MgCO_3$ : gráfico da PCA com primeiro e segundo componente principal das amostras NAT (solo nativo da Usina Goiasa), MN+JE (Comunidade do biorreator com meio MN+JE) e MN+JE+ $MgCO_3$ (Comunidade do biorreator com o meio MN+JE+ $MgCO_3$ ), baseados nos valores de absorbância do Biolog EcoPlate a 595 nm. ....	92
Figura 33 – Comunidade do solo Nativo da Usina Goiasa (NAT), Biorreator MN+JE e Biorreator MN+JE+ $MgCO_3$ : PCA dos dois primeiros componentes principais para as 31 fontes de C, com base nos valores de absorbância do Biolog EcoPlate.....	93

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fontes de Carbono avaliadas no Biolog Ecoplate.....	28
Tabela 2. Número de Unidades Formadoras de Colônias nas Usinas Jalles Machado e Goiasa.....	38
Tabela 3 – Capacidade de metabolização da comunidade microbiana dos biorreatores com meio MN+JE e meio MN+JE+MgCO <sub>3</sub> com 36 horas de crescimento em biorreator e 120 horas de incubação em placas Biolog EcoPlate, dados representados por grupos. ....	89

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	16
2.1	QUALIDADE DO SOLO .....	19
2.2	DIVERSIDADE MICROBIANA DO SOLO .....	20
2.3	DIVERSIDADE METABÓLICA .....	21
2.4	METABOLÔMICA/METAMETABOLÔMICA .....	22
3	JUSTIFICATIVA .....	24
4	OBJETIVOS .....	25
4.1	OBJETIVOS GERAIS .....	25
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
5	MATERIAIS E MÉTODOS .....	26
5.1	AMOSTRAGEM E CARACTERÍSTICAS DO SOLO .....	26
5.2	QUANTIFICAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS .....	26
5.3	DIVERSIDADE METABÓLICA (BIOLOG) .....	27
5.4	CINÉTICA DE CRESCIMENTO DA COMUNIDADE MICROBIANA DO SOLO DA USINA GOIASA .....	29
5.4.1	Preparo e conservação do inóculo .....	29
5.4.2	Seleção dos meios de cultura com maior taxa de crescimento dos micro- organismos .....	29
5.4.3	Tamponamento do biorreator com tampão $K_2HPO_4$ .....	31
5.4.4	Tamponamento do biorreator com os tampões $MgCO_3$ , $NaOH$ , $Na_2CO_3$ e $KOH$ .....	31
5.5	DETERMINAÇÃO DA DIVERSIDADE METABÓLICA DOS MICRO- ORGANISMOS DOS BIORREADORES COM MEIO MN+JE E MEIO MN+JE+ $MgCO_3$ .....	32
5.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	33
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
6.1	AMOSTRAGEM DOS MICRO-ORGANISMOS .....	35
6.2	DETERMINAÇÃO DO PERFIL METABÓLICO DAS COMUNIDADES MICROBIANAS - UTILIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS POR CLASSE .....	39
6.2.1	Avaliação do Sistema Biolog EcoPlate .....	40
6.2.1.1	Polímeros .....	43
6.2.1.2	Carboidratos .....	46

6.2.1.3 Ácidos Carboxílicos .....	51
6.2.1.4 Aminoácidos.....	55
6.2.1.5 Amina/Amida .....	58
6.2.1.6 Miscelâneas.....	61
6.3 ANÁLISE DOS COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) DA UTILIZAÇÃO DAS FONTES DE CARBONO PELA COMUNIDADE MICROBIANA DAS USINAS JALLES MACHADO E GOIASA. ....	63
6.3.1 PCA Polímeros.....	64
6.3.2 PCA Carboidratos .....	66
6.3.3 PCA Ácidos Carboxílicos .....	69
6.3.4 PCA Aminoácidos .....	71
6.3.5 PCA Amina/Amida .....	74
6.5.6 PCA Miscelâneas.....	76
6.4 CINÉTICA DE CRESCIMENTO DA COMUNIDADE MICROBIANA DO SOLO NATIVO DA USINA GOIASA.....	80
6.4.1 Seleção dos meios de cultura com melhor taxa de crescimento .....	80
6.4.2 Tamponamento do biorreator com tampão $K_2HPO_4$ .....	83
6.4.3 Tamponamento do biorreator com os tampões $MgCO_3$ , $NaOH$ , $Na_2CO_3$ e $KOH$ . .....	85
6.5 DETERMINAÇÃO DO PERFIL METABÓLICO DA COMUNIDADE MICROBIANA DOS BIORREADORES COM MEIO MN+JE E MEIO MN+JE+ $MgCO_3$ – UTILIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS POR GRUPOS (BIOLOG ECOPLATE) .....	88
6.6 ANÁLISE DOS COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) DA UTILIZAÇÃO DAS FONTES DE CARBONO PELA COMUNIDADE MICROBIANA DA USINA GOIASA E DOS BIORREADORES CONTENDO OS MEIOS MN+JE E MN+JE+ $MgCO_3$ .....	91
7 CONCLUSÃO.....	95
8 PERSPECTIVAS.....	95
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	98

## 1 INTRODUÇÃO

O desmatamento e a degradação do solo pela agricultura intensiva estão entre as mudanças mais significativas realizadas pelo homem no ambiente. A conversão de áreas florestais para áreas de cultivo tem como resultado a diminuição da matéria orgânica do solo, a diminuição da biomassa e da atividade microbiana. A compreensão dessas mudanças após a conversão de mata para área de cultivo é importante para o desenvolvimento de práticas agrícolas sustentáveis, embora haja um consenso que estes padrões promovam mudanças nas comunidades microbianas do solo em resposta ao processo de conversão, tais dinâmicas ainda não foram esclarecidas (BRACKIN et al., 2013).

A comunidade microbiana do solo apresenta papéis importantes na saúde ambiental, dentre eles é válido ressaltar os vários ciclos biogeoquímicos, a saúde e nutrição das plantas, bem como a fertilidade do solo (LI et al., 2013). No entanto, a atividade agrícola leva a mudanças na biodiversidade do solo devido à diminuição do número de diferentes espécies de plantas, animais e micro-organismos que habitam o ambiente em equilíbrio. Essa mudança causa a diminuição da comunidade microbiana e a alteração da atividade de enzimas extracelulares produzidas por micro-organismos e conseqüentemente a baixa fertilidade do solo (PARTELLI, 2009).

O uso intensivo do solo nas plantações principalmente em monoculturas, como é o caso da cana-de-açúcar, contribui para a redução dos estoques de C orgânico, diminuição da capacidade de troca catiônica (CTC) e pH, também promove a elevação da densidade de metais introduzidos por meio de impurezas de fertilizantes. Alguns estudos ainda demonstram que neste tipo de plantio a diminuição da biomassa microbiana do solo após a conversão de floresta para cultivo de cana-de-açúcar com mais de 20 anos é cerca de 60 e 70% (DOMINY et al. 2002; ARAÚJO; GOEDERT; LACERDA, 2007). Observa-se nestes estudos que as alterações da qualidade do solo são mais pronunciadas nos sistemas de cultivos convencionais do que nos sistemas não convencionais, principalmente o orgânico (ARAÚJO; GOEDERT; LACERDA, 2007).

A cana-de-açúcar é uma cultura de importância global, utilizada para produção de açúcar e biocombustível, suas plantações abrangem mais de 23 milhões de hectares em regiões subtropicais e tropicais, esse tipo de cultura é caracterizado por longos períodos de monocultura, que resulta na mudança das propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (BRACKIN et al., 2013).

Atualmente no Brasil as principais formas de cultivo da cana-de-açúcar são o manejo convencional e orgânico. O sistema de plantio convencional foi constituído de safras de alto rendimento, devido há implantação de sistemas de irrigação, a utilização de fertilizantes e agrodefensivos que no período de sua implantação foi denominado de “Revolução Verde”, em que o principal objetivo era aumentar a produtividade de cada hectare de solo. Logo após foi implantada a modificação genética de plantas que produziu exemplares com germinações mais rápidas, mais resistentes as doenças e passaram a possuir menores portes e maior desenvolvimento na parte produtiva (AGUIAR; MONTEIRO, 2005).

No cultivo convencional da cana-de-açúcar são utilizados agrodefensivos para obtenção de um maior rendimento da área plantada, sem que ocorra o ataque de pragas. As plantas daninhas são consideradas um dos problemas que mais oneram no setor canavieiro, visto que são responsáveis por até 80% das perdas de produção (AZANIA, 2004).

A produção orgânica busca obter sustentabilidade econômica, aproveitando e reciclando o máximo de energia e nutrientes possíveis durante o processo produtivo, respeitando o ambiente ecológico de forma a causar o mínimo de alterações no equilíbrio dos organismos envolvidos no processo e no ambiente (AQUINO; ASSIS, 2007).

Os micro-organismos estão ligados a diversos processos ecológicos do solo, e são altamente sensíveis as alterações ambientais, por estarem na base da cadeia trófica esses possuem um grande potencial para serem usados como marcadores da qualidade do solo (HAIFANG et al., 2013).

O estudo e a caracterização da comunidade microbiana do solo é um parâmetro de difícil avaliação, devido ao fato de apenas uma pequena porcentagem desses micro-organismos apresentarem a capacidade de serem cultivados em laboratório. O surgimento de novos métodos moleculares e bioquímicos

(metagenômica, metatranscriptômica, metaproteômica e metametabolômica) tem auxiliado na obtenção de melhores resultados e de forma mais sensíveis, na caracterização da diversidade de micro-organismos do solo (ZILLI et al., 2003; SIGGINS; GUNNIGLE; ABRAM, 2012).

O objetivo deste trabalho foi estudar o perfil metabólico da comunidade microbiana de solos de áreas de cultivo de cana-de-açúcar sob manejo convencional e orgânico e compará-la a comunidade microbiana de solo sob cerrado nativo.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 QUALIDADE DO SOLO

A qualidade do solo é um parâmetro que avalia a capacidade específica de uma determinada classe de solo, observando sua funcionalidade dentro de limites de um ecossistema natural ou manejado, sustentando a produtividade biológica, a manutenção da qualidade e a promoção da saúde seja ela animal ou vegetal (SOIL SCIENCE SOCIETY OF AMERICA, 1997).

A seleção de indicadores da qualidade de solo devem integrar as propriedades químicas, físicas e biológicas, deve ser sensível ao manejo e as variações climáticas. O uso de indicadores de sustentabilidade do manejo do solo como a conservação da biodiversidade do ecossistema, tem sido ignorado, no entanto esses são de grande importância nas relações com os indicadores de qualidade do solo e funções do ecossistema na conservação dos recursos solo e água (VEZZANI; MIELNICZUK, 2009).

A qualidade do solo hoje, não é mais vista apenas como um solo com boa fertilidade, mais também com uma boa estruturação e que contenha uma grande diversidade de macro e micro-organismos (ZILLI et al., 2003; ARAÚJO; MONTEIRO, 2007). A utilização da diversidade microbiana vem sendo proposta pelo fato de manter-se naturalmente inalterada ao longo do ano, mas com predomínio de algumas espécies em determinadas estações do ano (JOHNSON; LEE; SCOW, 2003). Em alguns casos, alterações ocorridas nas comunidades microbianas, na atividade microbiana, e na concentração de enzimas extracelulares secretadas podem preceder mudanças nas propriedades químicas e físicas do solo, mostrando uma melhoria ou a degradação da área (CORREIA; OLIVEIRA, 2000; ARAÚJO; MONTEIRO, 2007).

As características microbianas do solo estão sendo avaliadas cada vez mais, como indicadores sensíveis da saúde e qualidade do solo, isso ocorre devido as relações entre a diversidade microbiana e a qualidade do solo e planta, também a sustentabilidade dos ecossistemas (ARAÚJO; MONTEIRO, 2007).

## 2.2 DIVERSIDADE MICROBIANA DO SOLO

Os micro-organismos representam a forma de vida mais diversificada e abundante do planeta, sendo os mais ricos na diversidade química e molecular na natureza, atuando nos processos químicos, ecológicos, biogeoquímicos e na cadeia trófica. A biomassa microbiana do solo (BMS) é responsável pelos processos bioquímicos e biológicos no solo, podendo ser alterada pelas condições impostas pelo ambiente de forma bastante sensível (BALOTA et al., 2003).

A comunidade microbiana de solo desempenha um importante papel na ciclagem de nutrientes, ela é o principal componente biológico responsável pela decomposição da matéria orgânica, produção do húmus, realização do ciclo de nutrientes no solo e dá estruturação física ao solo (BALOTA et al., 2003).

Parâmetros microbiológicos podem ser utilizados para avaliar a fertilidade do solo, alguns desses parâmetros são: o número de micro-organismos presentes no solo, nitrificação, decomposição da celulose, liberação de CO<sub>2</sub>, fixação biológica de nitrogênio, potencial de oxidação-redução e atividade catabólica (ARAÚJO; MONTEIRO, 2007).

As seleções de indicadores da qualidade de solo devem integrar as propriedades químicas, físicas e biológicas, deve ser sensíveis ao manejo e as variações climáticas (HILL et al., 2000). A diversidade de micro-organismos como indicador da qualidade do solo vem sendo estudada e com o surgimento das técnicas de biologia molecular e caracterização bioquímica, tem favorecido a determinação das comunidades microbianas (TIEDJE et al., 2001).

Atividade biológica do solo está intimamente associada com a estabilidade física do solo, vários estudos mostram o impacto da estrutura do solo sobre a estrutura e diversidade da comunidade microbiana (ZHANG et al., 2010; ZHANG et al., 2011; ZHAO et al., 2012; BRACKIN et al., 2013; YINGHUA et al., 2012). Os micro-organismos têm uma grande capacidade de resistir a stress (resistência) e posteriormente, recuperar-se (resiliência), definido como a estabilidade do ecossistema. O conceito de estabilidade biológica tem sido demonstrada em ambas características do solo: físicas e biológicas (ZHANG et al., 2010). A estrutura e diversidade das comunidades microbianas do solo desempenham um papel

fundamental na função e viabilidade dos solos. Portanto, as alterações quantitativas e qualitativas, na composição da microbiota do solo podem servir como indicadores importantes e sensíveis às mudanças de curto e longo prazo na saúde do solo (BRACKIN et al., 2013).

### *2.3 DIVERSIDADE METABÓLICA*

Os micro-organismos do solo possuem alta variabilidade metabólica e tem a capacidade de realizar interações com as estruturas físicas e químicas do solo, atuando no controle biológico de patógenos por meio das associações simbióticas com as raízes, influenciam na solubilização de minerais e auxiliam a estruturação e agregação do solo (ARAÚJO; MONTEIRO, 2007).

A diversidade metabólica da comunidade microbiana de solo está relacionada com a participação dos micro-organismos nos processos chaves de ciclagem de C e N, decomposição de moléculas orgânicas complexas entre outras transformações. A decomposição microbiana dos detritos é uma função crítica, que regula a produtividade do ecossistema, por meio da transformação de nutrientes e desempenha um papel chave no desenvolvimento e restauração do solo (ZHANG; WANG; YAO, 2012).

Acredita-se que geralmente as medições diretas de diversidade metabólica ou funcional das comunidades microbianas do solo, são susceptíveis de fornecer informações mais relevantes para funcionamento de solos, mais do que as medidas de diversidade de espécies. A utilização de testes com fontes de carbono é uma maneira de medir a diversidade funcional e tem sido aplicada a uma grande variedade de habitats de solo (ZAK, et al., 1994; ZHANG et al., 2010; ZHANG et al., 2011; ZHAO et al., 2012; BRACKIN et al., 2013; YINGHUA et al., 2012).

A utilização da metodologia Biolog utilizando microplacas Biolog Ecoplate apresenta as vantagens de possuir uma alta sensibilidade e resolução, facilita aquisição de características da “impressão digital” metabólica das comunidades microbianas, mantêm as características metabólicas originais, sem a necessidade de

bactérias isoladas ou cultivadas, além de ser um teste rápido e eficiente na avaliação do perfil metabólico.

#### *2.4 METABOLÔMICA/METAMETABOLÔMICA*

A tecnologia utilizada como ferramenta de fornecimento de uma visão geral de forma qualitativa e quantitativa dos metabólitos presentes em um organismo é denominada metabolômica (HALL, 2006). No entanto observa-se na atualidade derivações da terminologia, ampliando a sua definição para comunidades, como é o caso da metametabolômica, termo empregado para determinar os metabólitos produzidos coletivamente por todos os micro-organismos do ecossistema, onde esses metabólitos são resultantes dos processos celulares. Os dados gerados a partir dessa tecnologia podem identificar as vias metabólicas dentro de um ecossistema, sendo uma ferramenta de grande utilidade na avaliação da diversidade funcional. Tais ferramentas referem-se aos padrões metabólicos ou às “impressões digitais” bioquímicas dos processos celulares, sendo a metabolômica de forma individual e a metametabolômica de forma coletiva dos micro-organismos (SIGGINS; GUNNIGLE; ABRAM, 2012).

Os micro-organismos coexistem em comunidades mistas em seu habitat natural, como grande parte dos micro-organismos presentes no ambiente não podem ser cultivados em laboratório, sua investigação requer a utilização de técnicas moleculares (SIGGINS; GUNNIGLE; ABRAM, 2012). As principais técnicas utilizadas para capturar informações funcionais dos micro-organismos do ecossistema são: investigação de informações através de DNA (metagenômica), RNA (metatranscriptômica), proteínas (metaproteômica) e metabólitos (metametabolômica) (ROLING et al., 2000; SIGGINS; GUNNIGLE; ABRAM, 2012).

O perfil metabólico da comunidade microbiana de solo utilizando o ensaio de Biolog é um método rápido e popular. No entanto essa técnica tem sido adaptada e utilizada como uma medida para caracterização das características funcionais de comunidades microbianas. A diversidade de funções referentes à decomposição realizada por micro-organismos heterotróficos representa um componente importante da diversidade funcional microbiana (BRACKIN et al., 2013).

As avaliações da diversidade metabólica são realizadas utilizando um padrão de utilização de diferentes substratos como fonte de C pela comunidade microbiana do solo, no início essa técnica utilizava placas contendo sais de tetrazólio e 95 substratos diferentes como fonte de carbono (microplacas Biolog<sup>TM</sup>), no entanto mais recentemente essas placas foram adaptadas utilizando o mesmo princípio do método, só que passaram a utilizar apenas 31 substratos diferentes como fonte de C (Biolog Ecoplate). Nesta metodologia a diversidade metabólica é definida pelo número, tipo e índice de utilização do conjunto de substratos pela comunidade microbiana (GARLAND; MILLS, 1991; JANNICHE; SPLIID; ALBRECHTSEN, 2012).

A metodologia Biolog é utilizada para determinar diferenças temporais e espaciais entre as comunidades microbianas de vários solos, bem como na rizosfera (GRAYSTONE; CAMPBELL; VAUGHAN, 1994). Também tem sido utilizada para determinar diferença da comunidade microbiana em diferentes utilizações e tipos de solo (LI et al., 2013; CHEN et al., 2013).

O perfil metabólico é uma ferramenta de grande importância na avaliação das características das comunidades microbianas, bem como a resposta a estímulos externos.

### **3 JUSTIFICATIVA**

A grande demanda na produção de açúcar e álcool nos próximos anos tem como consequência um aumento esperado nas áreas de cultivo de cana-de-açúcar (CONAB, 2013). Vários estudos mostraram que esta monocultura tem severo impacto na fertilidade do solo (ARAÚJO; GOEDERT; LACERDA, 2007; COSTA; GOEDERT; SOUZA, 2006; BRACKIN et al., 2013). Algumas alternativas de manejos têm sido utilizadas com o intuito de reduzir este impacto (AQUINO; ASSIS, 2007). No entanto, a muito a se descobrir sobre os efeitos do impacto dos manejos do solo sobre a microbiota, sua diversidade e sua capacidade funcional (BRACKIN et al., 2013).

Assim, este estudo se justifica por propor uma avaliação da capacidade de metabolização da comunidade microbiana de áreas de cultivo de cana-de-açúcar com manejos convencional e orgânico.

## **4 OBJETIVOS**

### *4.1 OBJETIVOS GERAIS*

Avaliar a comunidade microbiana de solo de cerrado nativo e compará-la a comunidade microbiana de áreas de cultivo de cana-de-açúcar em manejo convencional e orgânico e também avaliar o crescimento da comunidade em biorreatores.

### *4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS*

- Avaliar a quantidade de unidades formadoras de colônias (células viáveis) em solos sob manejo convencional, orgânico e do solo nativo do cerrado;
- Caracterizar o perfil metabólico da comunidade microbiana dos solos sob manejo convencional, orgânico e do solo nativo do cerrado;
- Testar condições de crescimento e produção de biomassa da microbiota do solo do cerrado em biorreatores.
- Avaliar o perfil metabólico da comunidade microbiana do solo do cerrado em biorreatores.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 AMOSTRAGEM E CARACTERÍSTICAS DO SOLO

As amostras de solo foram coletadas nas profundidades de 0 a 20 cm, em três diferentes solos (manejo convencional, orgânico e solo nativo) em outubro de 2011, em duas Usinas sucroalcooleiras, sendo: Usina Jalles Machado no município de Goianésia-GO (Lat. -15,32; Long. -49,12; Alt. 640m) e Usina Goiás (Lat. -18,01; Long. -49,35; Alt. 774m) no município de Goiatuba-GO, dados do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) (SCARPARE, 2011). As amostras de solo utilizadas foram cultivadas com cana-de-açúcar (*saccharum officinarum*), sob manejo convencional (CON) e orgânico (ORG) e um solo sob vegetação nativa do cerrado (NAT). Foram coletados três pontos para cada área, as amostras coletadas foram acondicionadas em sacos plásticos, mantidas a 4°C em caixa térmica e transportadas ao laboratório para realização dos testes.

De acordo com Koppen o clima local das duas usinas é classificado como tropical de savana, quente e úmido, com inverno seco e verão chuvoso (Aw). E a média pluvial anual é de 1.500 mm. O solo das usinas foram classificados pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) como Latossolo vermelho amarelo (LVm) para Usina Jalles Machado e Latossolo vermelho eutroférrico (Lvef) para a Usina Goiás (GONÇALVES; BORGES; SILVA, 2009; SCARPARE, 2011).

### 5.2 QUANTIFICAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS

As amostras de solo foram tamizadas (2 mm), homogeneizadas e alíquotas de (1g) solo foram adicionadas a erlenmeyers estéreis contendo (9mL) de solução salina (NaCl a 0,85%) esterilizada em autoclave e homogeneizadas durante 30 min. Foram realizadas diluições ( $10^{-3}$ ) das suspensões de solo em solução salina 0,85% estéril e alíquotas de (100µL) foram inoculadas em placas de Petri contendo meio

nutriente (MN) sólido ( extrato de carne 3,0 g; peptona 5,0 g; glicose 10,0 g; ágar 15,0 g em 1L de solução).

Todas as amostras foram inoculadas em triplicata e incubadas a 35°C em estufa bacteriológica. Após 24h, as Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foram contadas e expressas como UFC g<sup>-1</sup> de solo.

Na quantificação das UFCs nas duas Usinas o manejo orgânico do solo foi realizado em um período superior a 5 anos, prazo estipulado para que um solo que recebeu aplicação de produtos químicos seja considerado de natureza orgânica.

### 5.3 DIVERSIDADE METABÓLICA (BIOLOG)

Os padrões de utilização de substratos por parte da comunidade microbiana do solo foram determinados utilizando microplacas Biolog® Ecoplate (Biolog, Inc., Hayward, USA), procedimento adaptado de GARLAND e MILLS (1991). Cada placa contém 31 fontes de carbono distintas e um branco (Tabela 1). As fontes de carbono incluem aminoácidos, amins, carboidratos, ácidos carboxílicos, polímeros e miscelâneas. A taxa de utilização das fontes de C é indicada pela redução de um corante tetrazólio, que muda de incolor para roxo, indicando que o teste é positivo (GRAHAM; HAYNES, 2005).

No procedimento foram adicionados 10 g de solo em 90 mL de solução salina (NaCl 0,85%) esterilizada em autoclave, a suspensão foi homogeneizada por 30 minutos a 200 rpm, após a homogeneização foi realizada uma diluição de 10<sup>-3</sup> em solução salina 0,85% estéril. Uma alíquota de 150 µL da suspensão foi inoculada em cada poço da microplaca, as placas foram incubadas a aproximadamente 23°C e a medida do desenvolvimento de cor foi determinado após 120 h de incubação. A absorbância das amostras foram realizadas em leitor de placas de ELISA a 595 nm utilizando o software de análise de dados Gen5<sup>TM</sup> (Biotek, Winnoski, USA).

**Tabela 1** - Fontes de Carbono avaliadas no Biolog EcoPlate

<b>Biolog EcoPlate</b>		
<b>A1</b>	ÁGUA	CONTROLE
<b>A2</b>	β-METIL-D-GLICOSÍDEO	CARBOIDRATO
<b>A3</b>	ÁCIDO D-GALACTURÔNICO γ-LACTONA	ÁCIDO CARBOXÍLICO
<b>A4</b>	L-ARGININA	AMINOÁCIDO
<b>B1</b>	ÉSTER METÁLICO DO ÁCIDO PIRÚVICO	MISCELÂNIA
<b>B2</b>	D-XILOSE	CARBOIDRATO
<b>B3</b>	ÁCIDO D-GALACTURÔNICO	ÁCIDO CARBOXÍLICO
<b>B4</b>	L-ASPARAGINA	AMINOÁCIDO
<b>C1</b>	TWEEN 40	POLÍMERO
<b>C2</b>	i-ERITRITOL	CARBOIDRATO
<b>C3</b>	ÁCIDO 2-HIDROXIBENZÓICO	ÁCIDO CARBOXÍLICO
<b>C4</b>	L-FENILALANINA	AMINOÁCIDO
<b>D1</b>	TWEEN 80	POLÍMERO
<b>D2</b>	D-MANITOL	CARBOIDRATO
<b>D3</b>	ÁCIDO 4-HIDROXIBENZÓICO	ÁCIDO CARBOXÍLICO
<b>D4</b>	L-SERINA	AMINOÁCIDO
<b>E1</b>	α-CICLODEXTRINA	POLÍMERO
<b>E2</b>	N-ACETIL-D-GLICOSAMINA	CARBOIDRATO
<b>E3</b>	ÁCIDO γ-HIDROXIBUTÍRICO	ÁCIDO CARBOXÍLICO
<b>E4</b>	L-TREONINA	AMINOÁCIDO
<b>F1</b>	GLICOGÊNIO	POLÍMERO
<b>F2</b>	ÁCIDO-D-GLICOSAMÍNICO	ÁCIDO CARBOXÍLICO
<b>F3</b>	ÁCIDO ITACÔNICO	ÁCIDO CARBOXÍLICO
<b>F4</b>	ÁCIDO GLICIL-L-GLUTÂMICO	AMINOÁCIDO
<b>G1</b>	D-CELOBIOSE	CARBOIDRATO
<b>G2</b>	GLICOSE-1-FOSFATO	MISCELÂNIA
<b>G3</b>	ÁCIDO α-CETOBUTÍRICO	ÁCIDO CARBOXÍLICO
<b>G4</b>	FENILETILAMINA	AMINA/AMIDA
<b>H1</b>	α-D-LACTOSE	CARBOIDRATO
<b>H2</b>	D,L-α-GLICEROL FOSFATO	MISCELÂNIA
<b>H3</b>	ÁCIDO D-MÁLICO	ÁCIDO CARBOXÍLICO
<b>H4</b>	PUTRESCINA	AMINA/AMIDA

\*Categorização dos substratos (Fontes de C) sugerida por DOBRANIC e ZAK (1999).

## 5.4 CINÉTICA DE CRESCIMENTO DA COMUNIDADE MICROBIANA DO SOLO DA USINA GOIASA

### 5.4.1 Preparo e conservação do inóculo

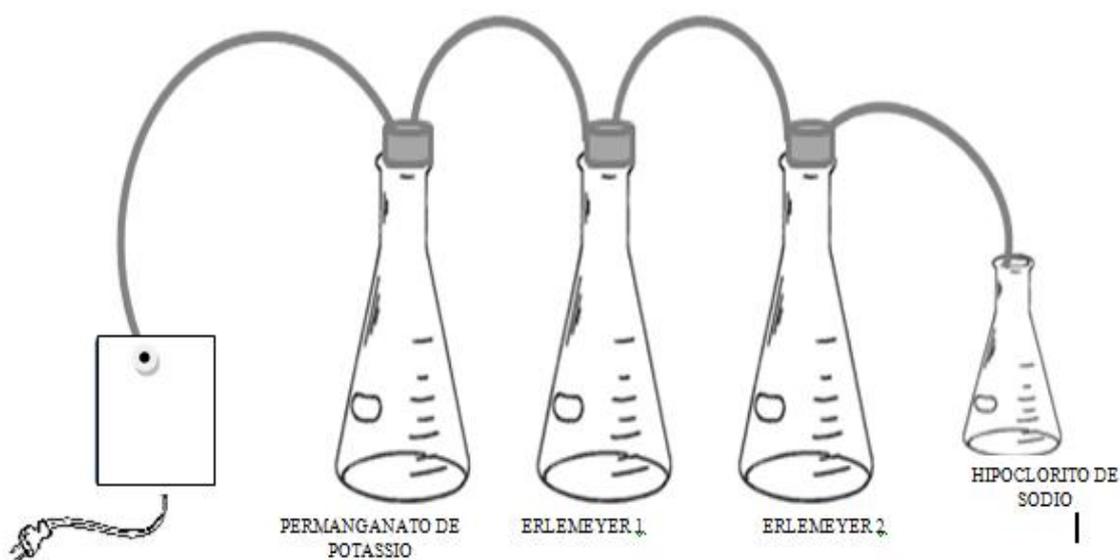
As amostras de solo após serem tamizadas (2mm) foram diluídas em solução salina estéril (0,85%), até se obter uma diluição de  $10^{-3}$ , 1mL dessa diluição foi inoculado em um erlenmeyer de 250 mL contendo 100ml de Meio Nutriente (MN) (extrato de carne 3,0 g; peptona 5,0 g; glicose 10,0 g em 1L de solução). As amostras foram mantida sob agitação em shaker a 200 rpm no período de 24 horas. Após esse período, alíquotas de 1 mL das amostras foram transferidas para microtubos estéreis e centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante descartado e sobre o precipitado foi adicionado 1mL de glicerol estéril a 20% em cada microtubo. Os mesmos foram mantidos a  $-20^{\circ}\text{C}$  para conservação das amostras.

### 5.4.2 Seleção dos meios de cultura com maior taxa de crescimento dos micro-organismos.

Para avaliação do meio de cultura com melhor crescimento da comunidade microbiana três meios de cultura foram utilizados:

- Meio Nutriente- (**MN**) (extrato de carne 3,0 g; peptona 5,0 g; glicose 10,0 g em 1L de solução);
- Meio Nutriente + Meio Jones e Edington – (**MN+JE**) (extrato de carne 3,0 g; peptona 5,0 g; glicose 10,0 g;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,5 g;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,5 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10,0 g;  $\text{FeCl}_2 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$  10,0 mg;  $\text{CaCl}_2$  10,0 mg;  $\text{MnCl}_2$  0,1 mg;  $\text{ZnSO}_4$  0,01 mg em 1 L de solução) e;
- Meio Jones e Edington suplementado com 1% de glicose - (**JE+G**) ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,5 g;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,5 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10,0 g;  $\text{FeCl}_2 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$  10,0 mg;  $\text{CaCl}_2$  10,0 mg;  $\text{MnCl}_2$  0,1 mg;  $\text{ZnSO}_4$  0,01 mg; glicose 10,0g em 1L de solução).

No preparo do inóculo foi utilizado o pré-inóculo armazenado em glicerol 20% a -20°C. Foram adicionados 20µL do pré-inóculo a 200 mL de meio nutriente em um erlenmeyer de 500mL estéril, o inóculo foi mantido sob agitação em shaker a 200 rpm no período de 24 horas, esse procedimento foi realizado para diminuir o efeito da fase *lag* na avaliação do crescimento da comunidade microbiana do solo. Após esse período, 50 mL da amostra foram adicionados a erlenmeyers de 1L contendo 500 mL de meio de cultura MN, MN+JE e JE+G (Biorreator) (Fig. 1).



**Figura 1.** Esquema do biorreator para crescimento da comunidade microbiana do solo da usina Goiasa.

Amostras dos biorreatores foram coletadas nos tempos 0, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas de crescimento da comunidade microbiana e os testes de DO, pH e dosagem de glicose foram realizados.

A leitura da densidade óptica (DO) foi avaliada utilizando espectrofotômetro UV/visível a 600 nm, o pH durante o crescimento foi avaliado utilizando potenciômetro digital e o consumo de glicose foi dosado utilizando o *kit comercial Doles*<sup>®</sup> de determinação enzimática de glicose.

#### **5.4.3 Tamponamento do biorreator com tampão $K_2HPO_4$ .**

No preparo do inóculo foi utilizado o pré-inóculo armazenado em glicerol 20% a  $-20^{\circ}C$ . Foram adicionados  $20\mu L$  do pré-inóculo a 200 mL de meio MN+JE em erlenmeyer de 500mL esterilizado em autoclave, o inóculo foi mantido sob agitação em shaker a 200 rpm no período de 24 horas, esse procedimento foi realizado para diminuir o efeito da fase *lag* na avaliação do crescimento da comunidade microbiana do solo. Após esse período 50 mL da amostra foram adicionados a um erlenmeyer de 1L contendo 500 mL de meio de cultura MN+JE (Biorretator), o experimento foi conduzido em duplicata.

Foram coletados pontos com 0, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas de crescimento da comunidade microbiana no biorreator. A cada retirada do ponto foi realizado a suplementação com  $0,05 \times 10^{-3}$  mol/L de  $K_2HPO_4$ , com objetivo de neutralizar o pH do meio MN+JE do biorreator, visto que os micro-organismos do solo apresentam crescimento no pH próximo de 5,5 – 6,0 característico do solo do cerrado goiano.

A leitura da densidade óptica (DO) foi avaliada utilizando espectrofotômetro UV/visível a 600nm, o pH durante o crescimento foi avaliado utilizando potenciômetro digital, e o consumo de glicose foi dosado utilizando o *kit comercial Doles*<sup>®</sup> de determinação enzimática de glicose.

#### **5.4.4 Tamponamento do biorreator com os tampões $MgCO_3$ , $NaOH$ , $Na_2CO_3$ e $KOH$ .**

No preparo do inóculo foi utilizado o pré-inóculo armazenado em glicerol 20% a  $-20^{\circ}C$ . Foram adicionados  $20\mu L$  do pré-inóculo a 200 mL de meio MN+JE em erlenmeyer de 500 mL, o inóculo foi mantido sob agitação em shaker a 200 rpm no período de 24 horas, esse procedimento foi realizado para diminuir o efeito da fase *lag* na avaliação do crescimento da comunidade microbiana do solo. Após esse período 50 mL da amostra foram adicionados a um erlenmeyer de 1L contendo 500 mL de meio de cultura MN+JE (Biorreator).

Foram coletados pontos com 0, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas de crescimento da comunidade microbiana do solo no biorreator. A cada retirada do ponto foi realizado a suplementação com os tampões sendo:

Biorreator 1 -  $MgCO_3$  (1mol), biorreator 2 - NaOH (1Mol), biorreator 3 -  $Na_2CO_3$  (1 mol) e biorreator 4 - KOH (1mol), com o objetivo de neutralizar o pH do meio MN+JE dos biorreatores, visto que os micro-organismos do solo apresentam crescimento no pH próximo de 5,5 – 6,0 característico do solo do cerrado goiano.

A leitura da densidade óptica (DO) foi avaliada utilizando espectrofotômetro UV/visível a 600 nm, o pH durante o crescimento foi avaliado utilizando potenciômetro digital e o consumo de glicose foi dosado utilizando o *kit comercial Doles*<sup>®</sup> de determinação enzimática de glicose.

#### 5.5 DETERMINAÇÃO DA DIVERSIDADE METABÓLICA DOS MICRO-ORGANISMOS DOS BIORRETORES COM MEIO MN+JE E MEIO MN+JE+ $MgCO_3$ .

O perfil de utilização de substratos como fonte carbono pela comunidade microbiana dos biorreatores com 36 horas de crescimento em meio MN+JE e MN+JE+ $MgCO_3$ , foi determinado utilizando microplacas Biolog Ecoplate (Biolog, Inc., Hayward, USA), procedimento adaptado de Garland e Mills (1991).

No preparo do inóculo foi utilizado o pré-inóculo armazenado em glicerol 20% a -20°C. Foram adicionados 20µL do pré-inóculo a 200 mL de meio nutriente (MN) em erlenmeyer de 500 mL, o inóculo foi mantido sob agitação em shaker a 200 rpm no período de 24 horas, esse procedimento foi realizado para diminuir o efeito da fase *lag* na avaliação do crescimento da comunidade microbiana. Após esse período 50 mL da amostra foram adicionados a um erlenmeyer de 1L contendo 500 mL de meio de cultura MN+JE (Biorreator) e um erlenmeyer de 1L contendo 500 mL de meio de cultura MN+JE+ $MgCO_3$  (Biorreator).

No procedimento foram utilizados 5 mL da cultura dos biorreatores com os meios MN+JE e MN+JE+MgCO<sub>3</sub> com 36 horas de crescimento. Para realização da lavagem das células, 5 ml da cultura dos biorreatores foram transferidos para tubos cônicos de 5mL estéreis em autoclave e centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e sobre o precipitado foram adicionados 5 mL de solução salina (0,85%) estéril, esse procedimento foi repetido duas vezes para realização da lavagem das células microbianas.

As suspensões de células lavadas foram adicionadas em tubos de 15 mL contendo solução salina (085%) esterilizada em autoclave, as suspensões foram diluídas até que as mesmas apresentassem a mesma turbidez da escala de 0,5 de MacFarland. Uma alíquota de 150 µL da suspensão padronizada foi inoculada em cada poço da microplaca Biolog EcoPlate, as placas foram incubadas a aproximadamente 23°C e a medida do desenvolvimento de cor foi determinado a cada 12 horas no período de 120 h. A absorbância das amostras foram realizadas em um leitor de placas de ELISA a 595 nm, utilizando o software de análise de dados Gen5™ (Biotek, Winnoski, USA).

## 5.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O experimento de quantificação dos micro-organismos (UFC) foi conduzido em triplicata e a média dos valores foram apresentados, o perfil metabólico foi realizado em triplicata e a média dos valores também foram reportados e o Software Statística (Statística 7.0 Stat Soft Inc, Tulsa), foi utilizado para analisar os dados. Foram realizados ANOVA seguido do teste de Tukey para determinar diferenças significativas nas amostras de solo, usando um nível de significância de 95%.

Na análise da diversidade metabólica, as 31 únicas fontes de carbono do Biolog EcoPlate foram divididas em seis categorias: Polímeros, Carboidratos, aminoácidos, ácidos carboxílicos, amina/amida e miscelâneas respectivamente, de acordo com sua estrutura química. Após a realização das leituras a 595nm, as absorbâncias foram normalizadas (descontado o valor do branco - WE) e os dados

foram submetidos a Análise de Componente Principal (PCA) e reportados em gráficos utilizando o Software Statística (Statistica 7.0 Stat Soft Inc, Tulsa).

A análise de componentes principais – (PCA) é um método estatístico que tem por finalidade reduzir os dados, eliminar sobreposições e escolher a forma mais representativa dos dados, ou seja, a PCA promove uma transformação linear nos dados, mostrando os componentes principais nas primeiras dimensões em eixos denominados principais (PC1, PC2, PC3,...). Essa análise está associada a redução de dados, com a menor perda possível das informações (REGAZZI, 2000).

Na PCA através da matriz de covariância é encontrado os autovalores e autovetores dos dados e com esse resultado é realizada a redução dimensional e então analisado os padrões principais de variabilidade dos dados, com isso é possível a visualização de diversas variáveis em um determinado conjunto de dados, tornando-se mais rápida, objetiva, produtiva e eficiente a análise dos dados (REGAZZI, 2000).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 AMOSTRAGEM DOS MICRO-ORGANISMOS

A avaliação da densidade populacional foi um parâmetro observado, por meio do número de micro-organismos da comunidade microbiana presente no solo. A utilização deste método permitiu verificar que o número de micro-organismos da comunidade microbiana mostrou-se mais elevada para a amostra de solo com manejo orgânico coletado na Usina Jalles Machado ( $195 \cdot 10^{-3}$  UFC  $g^{-1}$  de solo), obtendo valores similares para as amostras obtidas na área de manejo convencional ( $115 \cdot 10^{-3}$  UFC  $g^{-1}$  de solo) e na área solo nativo - (controle) ( $105 \cdot 10^{-3}$  UFC  $g^{-1}$  de solo) (Fig. 2A).

Nas amostras de solo, obtidas na Usina Goiasa (Fig. 2B), foi possível observar que o número de UFC presentes nas amostras de solo de manejo orgânico ( $124 \cdot 10^{-3}$  UFC  $g^{-1}$  de solo) e solo nativo ( $110 \cdot 10^{-3}$  UFC  $g^{-1}$  de solo) não mostraram diferenças estatísticas entre si, bem como estatisticamente não houve diferença entre o manejo convencional ( $75 \cdot 10^{-3}$  UFC  $g^{-1}$  de solo) e solo nativo ( $110 \cdot 10^{-3}$  UFC  $g^{-1}$  de solo).

Os resultados encontrados para amostras de solo de cultivo de cana-de-açúcar por métodos convencionais, bem como de solos nativos são similares aos encontrados por Xue-mei et al., (2007) ele encontrou um maior número de microrganismos (UFC) e maior número de bactérias fixadoras de nitrogênio em plantações de soja e milho, quando comparado a solos sob relva artificial e arbustos naturais e artificiais.

O maior número de UFC observada no solo sob manejo orgânico, pode ser explicado pela aplicação de inoculantes agrícolas, produtos contendo *Metarhizium* como agente de biocontrole. *Metarhizium anisopliae* é um hifomiceto entomopatogênico de grande importância na agricultura, devido seu elevado potencial prático no controle de pragas, especificamente de insetos (GUAGLIUMI; MARQUES; VILAS BOAS, 1974;. FERRON, 1981). *Metarhizium anisopliae* apresenta-se amplamente disseminado na natureza e é encontrado no solo e na rizosfera de

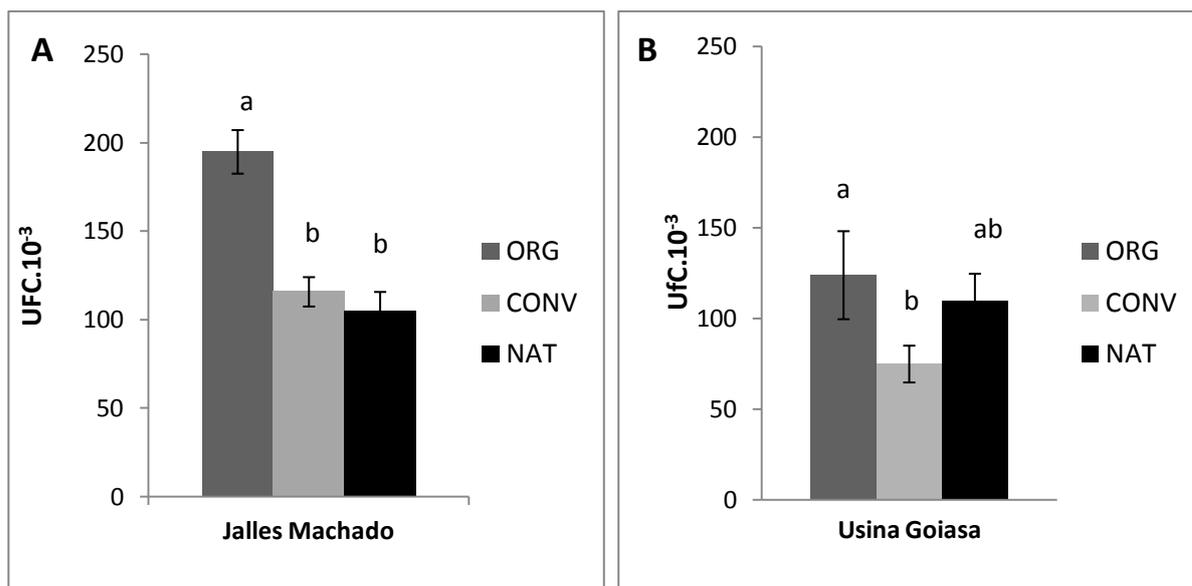
plantas ou cadáveres de artrópodes como saprófitas e também possui a capacidade de parasitar uma ampla gama de insetos e carrapatos (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010).

A aplicação de inoculante agrícola é um fator que ocorre periodicamente a cada 2 anos na Usina Goiasa e a cada 3 anos na Jalles (Registro documental das Usinas), essa aplicação pode ter alterado o número de micro-organismos, no entanto isso não significa uma maior diversidade nesse tipo de manejo. Análise de métodos moleculares como metagenômica pode ser uma ferramenta de grande importância para a avaliação dessa diversidade.

Outra hipótese para o maior número de micro-organismos nas amostras de solo sob cultivo orgânico pode estar relacionado à utilização de fertilizantes orgânicos os quais fornecem uma elevada gama de nutrientes essenciais tanto para a cultura em específico, como pode favorecer o crescimento (biomassa) de uma determinada microbiota. Tais fertilizantes podem deixar efeitos residuais principalmente quando estes são ricos em C-orgânicos, ou apresentam uma ampla relação C/N, o que pode levar a imobilização temporária do N. Fatores estes que podem restringir a produtividades das culturas, principalmente às dependentes de mineralização do N orgânico do solo (JANNOURA; BRUNS; JOERGENSENA, 2013).

A disponibilidade de N inorgânico no solo e a dinâmica de carbono podem ser alteradas por vários fatores, tais como, o aumento da mineralização decorrente das temperaturas elevadas, características indiscutíveis no Cerrado goiano, agem modificando o regime hidrológico e o ocorre o aumento de N externo devido à composição da matéria orgânica (DALMONECH et al., 2010).

Comparando de forma geral o número de unidades formadoras de colônias presente em todas as amostras de solos estudadas, foi possível verificar que o maior número de UFC g<sup>-1</sup> de solo, foi referente ao manejo orgânico da cana-de-açúcar, pertencente à usina Jalles Machado e o solo que apresentou o menor número de UFC g<sup>-1</sup> de solo foi referente ao cultivo convencional obtido das amostras de solo da usina Goiasa.



**Figura 2.** Determinação da UFC g<sup>-1</sup> de solo, em solos sob manejo orgânico e convencional e solo nativo nas Usina Jalles Machado (A) e Usina Goiasa (B). Letras iguais não se diferem estatisticamente.

Segundo Xue-mei et al., (2007) o revolvimento do solo é outro fator que pode afetar as comunidades microbianas presentes nos solos. Em seu estudo sobre os efeitos do tipo de vegetação na estrutura da comunidade microbiana do solo e diversidade catabólica avaliada por métodos polifásicos no norte da China, verificou que as biomassas de bactérias sob dois campos agrícolas eram mais elevadas, enquanto a biomassa de fungos foi maior no solo sob arbusto natural do que em outros solos e que os fungos encontrados seriam responsáveis por uma proporção maior em solos menos perturbado do que em solos frequentemente perturbados. Os fungos e bactérias diferem nas suas respostas a mudanças em práticas de gestão agrícolas. As bactérias nos campos agrícolas prosperam pois a superfície de contacto entre o substrato e as bactérias é aumentada, favorecendo assim seu desenvolvimento.

A Tabela 2 faz uma comparação entre os números de UFC g<sup>-1</sup> de solo por tipo de manejo nas duas usinas.

**Tabela 2.** Número de Unidades Formadoras de Colônias nas Usinas Jalles Machado e Goiasa.

<b>Número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC g<sup>-1</sup> de solo)</b>		
<b>Solo</b>	<b>Jalles Machado</b>	<b>Goiasa</b>
<b>Orgânico</b>	(195.10 <sup>-3</sup> ) <sup>a</sup>	(124.10 <sup>-3</sup> ) <sup>b</sup>
<b>Convencional</b>	(115.10 <sup>-3</sup> ) <sup>a</sup>	(75.10 <sup>-3</sup> ) <sup>b</sup>
<b>Nativo</b>	(105. 10 <sup>-3</sup> ) <sup>a</sup>	(110.10 <sup>-3</sup> ) <sup>a</sup>

\*Letras iguais na mesma linha não se diferem estatisticamente.

Como pode ser visualizado na tab. 2 o número de UFC g<sup>-1</sup> de solo nas duas usinas comportaram-se de forma distinta para os solos com cultivo orgânico e convencional, porem não apresentando diferença significativa para o solo nativo. A diferença observada no número de UFC g<sup>-1</sup> de solo no cultivo orgânico e convencional, provavelmente possa ser explicada pela composição distinta das amostras de solos estudados, bem como o manejo e a aplicação de produtos químicos nas Usina Jalles Machado e Usina Goiasa.

O solo onde a Usina Jalles Machado esta situada é classificado como Latossolo vermelho amarelo (LVm) que são solos bem drenados, caracterizados pela ocorrência de horizonte B latossólico de cores vermelhas a vermelho-amareladas, com teores de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> iguais ou inferiores a 11% e normalmente maiores que 7%, quanto a textura é argilosa ou muito argilosa. Em suas características químicas as principais limitações ao aproveitamento agrícola deste solo está relacionado com a necessidade de execução de práticas para correção química, tais como a adubação e a calagem (EMBRAPA, 1999).

O solo da Usina Goiasa é classificado como Latossolo vermelho eutroférico (Lvef) que apresenta características de ser mais vermelho na maior parte dos 100 cm de horizonte B. Apresenta teores de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (hematita) maior que 18%. As cores vermelhas ocorrem pela influência do material de origem e pela drenagem dos solos que favorecem a estabilidade da hematita, ele também possui a característica de ter a textura muito argilosa (74%) (EMBRAPA, 1999; BOGNOLA et al., 2011).

Jannoura, Bruns e Joergensen (2013) relata que a incorporação de adubos orgânicos no solo provoca um aumento grande e rápido na biomassa microbiana do solo, juntamente com o acúmulo de matéria orgânica proveniente das plantações. Já

Pignataro et al., (2012) em seu trabalho na Avaliação da diversidade microbiana funcional num sistema florestal cortado, ele indica que o tipo de manejo do solo é um fator que afeta fortemente a biomassa microbiana, e que um dos principais fatores relacionados é a utilização de substratos C.

Outros fatores que também podem ter influenciado no número de UFC g<sup>-1</sup> de solo são eles: diferença nos procedimentos de manejo do solo nas duas usinas, utilização de diferentes agrodefensivos e em concentrações distintas no manejo convencional, o tempo de cultivo da cana-de-açúcar nos solo, correções de pH, utilização de fertilizantes, entre outros. Huang et al., (2012) relata que as comunidades microbianas do solo são grupos extremamente complexos e muitos fatores físicos, fatores químicos e fatores antrópicos podem influenciá-los (pH, temperatura, a matéria orgânica do solo, as práticas de gestão humana, entre outros).

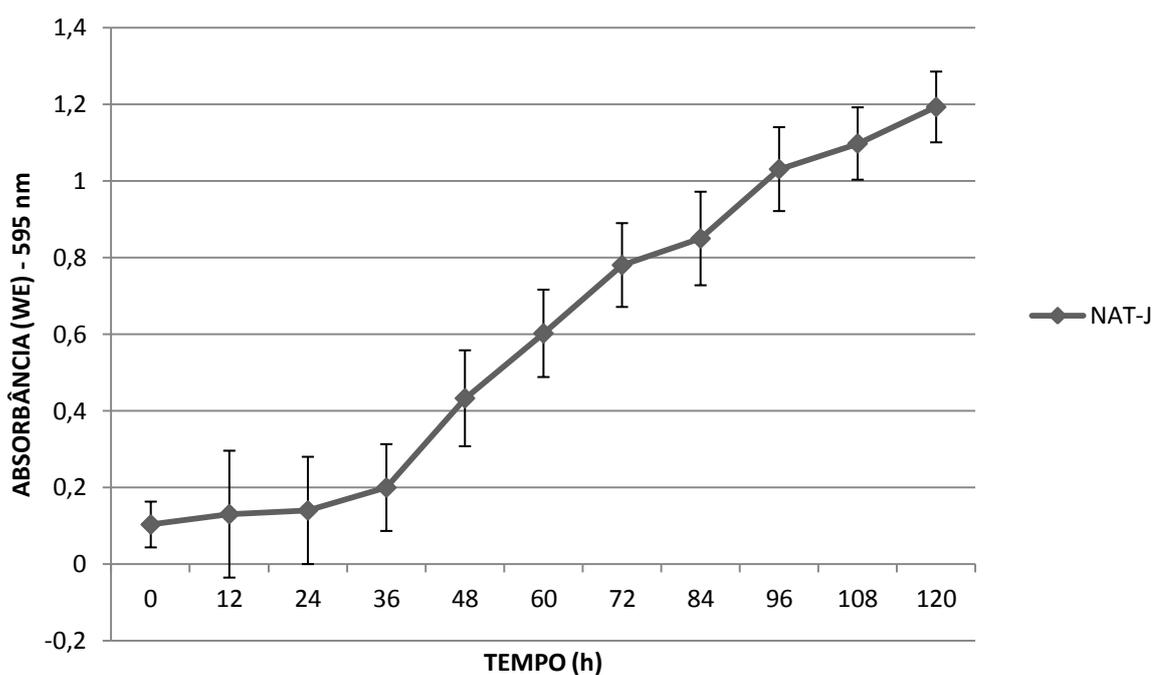
## *6.2 DETERMINAÇÃO DO PERFIL METABÓLICO DAS COMUNIDADES MICROBIANAS - UTILIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS POR CLASSE*

Após 120 horas de incubação das suspensões microbianas obtidas das amostras de solo coletadas na Usina Jalles Machado em sistema Biolog EcoPlate, a comunidade microbiana presente na amostra de solo sob cultivo orgânico de cana-de-açúcar foi capaz de metabolizar 29 fontes de carbono (substrato), enquanto que as amostras obtidas de solos sob cultivo convencional e amostras de solo nativo foram capazes de metabolizar 30 fontes de carbono. Após a incubação das amostras coletadas na Usina Goiás, nas mesmas condições de tempo (120 horas), a comunidade microbiana obtida do solo nativo foi capaz de metabolizar 30 das 31 fontes de carbono, enquanto a microbiota contida nas amostras de solo sob cultivo convencional metabolizou 29 destas fontes. A comunidade microbiana das amostras de solo sob cultivo orgânico não apresentou metabolização para nenhuma das 31 fontes presentes no sistema Biolog EcoPlate, o que levou essa amostra a ser retirada das análises posteriores.

### 6.2.1 Avaliação do Sistema Biolog EcoPlate

O índice de desenvolvimento de cor (WE) pode ser utilizado para refletir a capacidade metabólica da comunidade microbiana, frente à utilização de fontes de carbono unitária da comunidade microbiana.

A comunidade microbiana presente na amostra do solo nativo obtido na Usina Jalles Machado foi utilizada nesse teste para avaliar a eficácia do sistema Biolog EcoPlate frente à capacidade de metabolização das fontes de carbono de amostras de solo coletadas em áreas de plantio de cana-de-açúcar (Fig. 3).



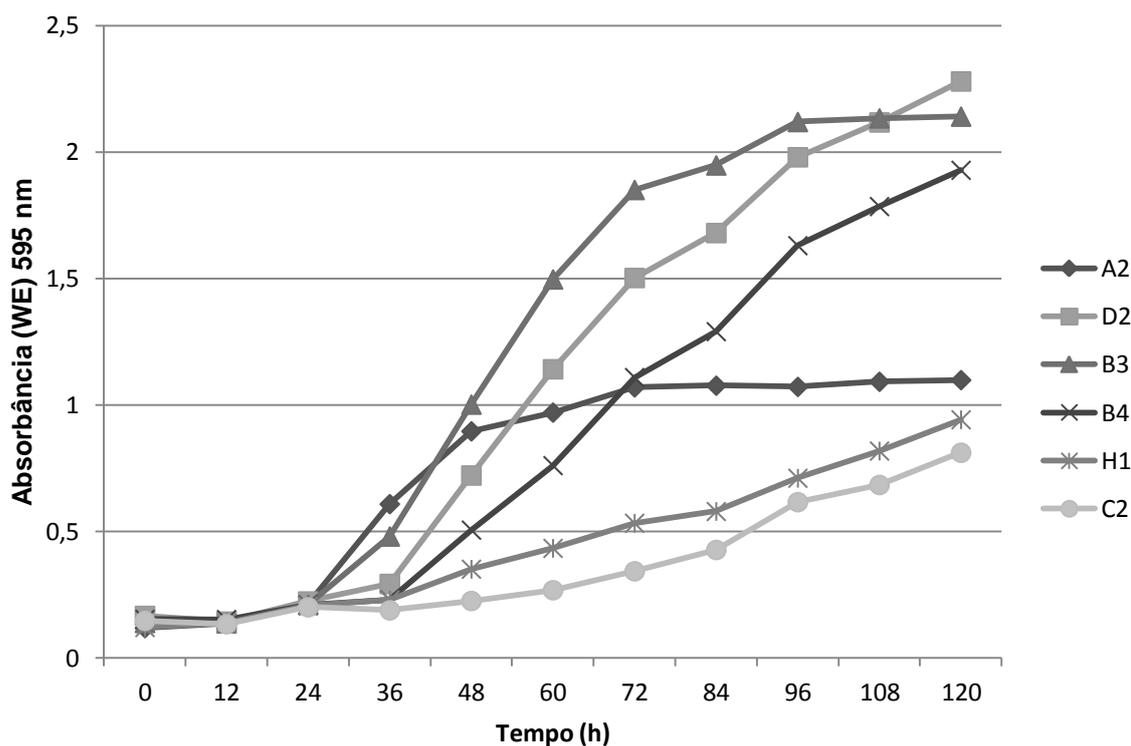
**Figura 3** - Avaliação das características dinâmicas da capacidade de utilização das fontes de carbono pela comunidade microbiana do solo nativo da Usina Jalles Machado (NAT-J), no período de 120h de incubação a  $\pm 25^{\circ}\text{C}$  em placa BIOLOG EcoPlate. Dados representados com média e desvio padrão em leitura a 595 nm.

Como resultado da característica dinâmica da capacidade de utilização das fontes de carbono foi demonstrado que a quantidade de fontes de carbono utilizadas pela comunidade microbiana na amostra de solo nativo coletado na Usina Jalles, aumentou gradualmente a medida que o tempo de incubação foi aumentando. Além disso, os valores do WE foram relativamente baixos, em um período de 36h de horas de incubação, o que indica que a comunidade microbiana estava em uma fase de adaptação (fase LAG) e as fontes passaram a ser metabolizadas de forma mais significativa após esse período. Após 36h de incubação a comunidade microbiana apresentou um aumento exponencial na capacidade de metabolização das fontes de carbono até o período de 120h de incubação.

Vários trabalhos (ZANG et al., 2013; LI et al., 2013, HUANG et al., 2012) apresentam uma curva de desenvolvimento de cor médio, obtido na placa considerando a degradação de todos os substratos, desta forma não se ilustra a capacidade máxima de degradação de cada substrato. No entanto, trabalhos como de (PRESTON-MAFHAM; BODDY; RANDERSON, 2002; YU-HONG et al., 2011) ilustram a média da degradação como os demais autores e ainda apresenta a cinética dos substratos que desviaram da metabolização média.

A figura 4 mostra o desenvolvimento de cor para algumas fontes de carbono escolhidas aleatoriamente com incubação em um período de 120 horas a  $\pm 25^{\circ}\text{C}$ .

Como pode ser observado (Fig. 4) as fontes de carbono apresentam diferenças em seu perfil de metabolização, a fonte A2 ( $\beta$ -Metil-D-Glicosídeo) em 60 horas de incubação já havia atingido sua degradação máxima. As fontes D2 (D-Manitol) e B4 (L-Asparagina) no período de incubação de 120 horas ainda se apresentavam na fase exponencial, e as fontes H1 ( $\alpha$ -D-Lactose) e C2 (i-Eritritol) também se apresentavam na fase exponencial, porém com um índice de metabolização mais baixo. A fonte B3 (Ácido D-Galacturônico) atingiu um alto índice de metabolização, no entanto a saturação desse substrato ocorreu com aproximadamente 96 horas de incubação.



**Figura 4** - Desenvolvimento da cor, durante um período de incubação de 120 horas ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ) da amostra do solo nativo da Usina Jalles Machado em microplacas Biolog EcoPlate. Fontes de carbono: A2-  $\beta$ -Metil-D-Glicosídeo (carboidrato), D2- D-Manitol (carboidrato), B3- Ácido D-Galacturônico (ácido carboxílico), B4- L-Asparagina (aminoácido), H1  $\alpha$ -D-Lactose (carboidrato) e C2- i-Eritritol (carboidrato), leituras da placa realizadas a 595 nm.

A quantificação do desenvolvimento da cor nas placas do Biolog EcoPlate são realizadas de forma individual, pois a capacidade máxima de degradação do substrato e conseqüentemente a liberação do cromóforo (coloração) nos poços individuais pode ser alcançada rapidamente por algumas fontes de carbono.

O desenvolvimento de cor para cada substrato segue uma curva sigmoideal, com tempo assintótico. As respostas individuais durante a degradação do substrato e a liberação do cromóforo, variam no que diz respeito ao tempo, com algumas comunidades tendo um longo atraso frente a outras. Assim, se faz necessário uma triagem da acurácia do tempo frente a degradação dos substratos, pois em algumas situações se o desenvolvimento de cor for muito rápido, poderá não obter dados confiáveis caso o tempo de leitura seja muito longo, atingindo apenas os pontos de saturação. Desta forma durante a análise do Biolog EcoPlate poderá não haver um

tempo ótimo para o monitoramento experimental (PRESTON-MAFHAM; BODDY; RANDERSON, 2002; YU-HONG et al., 2011).

### **6.2.1.1 Polímeros**

Polímeros insolúveis de carboidratos funcionam tanto como elementos estruturais quanto de proteção nas paredes celulares bacterianas e vegetais (NELSON; COX, 2011), e são de grande importância para manutenção da comunidade microbiana no solo.

Na utilização de polímeros como fonte de carbono pelos micro-organismos do solo, obtidos da Usina Jalles Machado, alguns polímeros como o Tween 40 (C1) e Tween 80 (D1) foram igualmente utilizados por todas as comunidades microbianas. Enquanto que a  $\alpha$ -ciclodextrina (E1) foi metabolizada de forma mais eficiente pela comunidade presente na amostra de solo nativo e o Glicogênio (F1) mais consumido pela comunidade presente na amostra de solo convencional e orgânico (Fig. 5A).

Nas amostras de solo, obtidas da Usina Goiasa, foi possível observar que a comunidade microbiana presente no solo sob cultivo convencional e no solo nativo foram capazes de metabolizar as fontes Tween (C1),  $\alpha$ -ciclodextrina (E1) e Glicogênio (F1) de forma eficiente sem apresentar diferenças significativas. A fonte Tween 80 (D1) foi a única a apresentar diferença significativa, onde a amostra de solo nativo apresentou atividade maior que a amostra obtida da área de cultivo de cana-de-açúcar por métodos convencionais (Fig. 5B).

Os tweens são ésteres de ácidos graxos de poliaxialquileno derivados de sorbitano, eles diferem apenas em um componente específico do ácido graxo. Tween 40 é um éster de ácido palmítico e Tween 80 um éster de ácido oléico. Tween 40 e Tween 80 são amplamente utilizados nas indústrias farmacêuticas, cosméticas e alimentícias, como veículos para compostos solúveis em gordura (LOPEZ et al., 2000; MALINGRE et al., 2001).

LIU et al., (2010) em estudo sobre o efeito de monoramínolípido e Tween 80 na degradação de fenol, mostrou que o Tween 80, também teve um efeito positivo sobre o crescimento celular e a remoção de fenol, mas o agente surfactante não foi

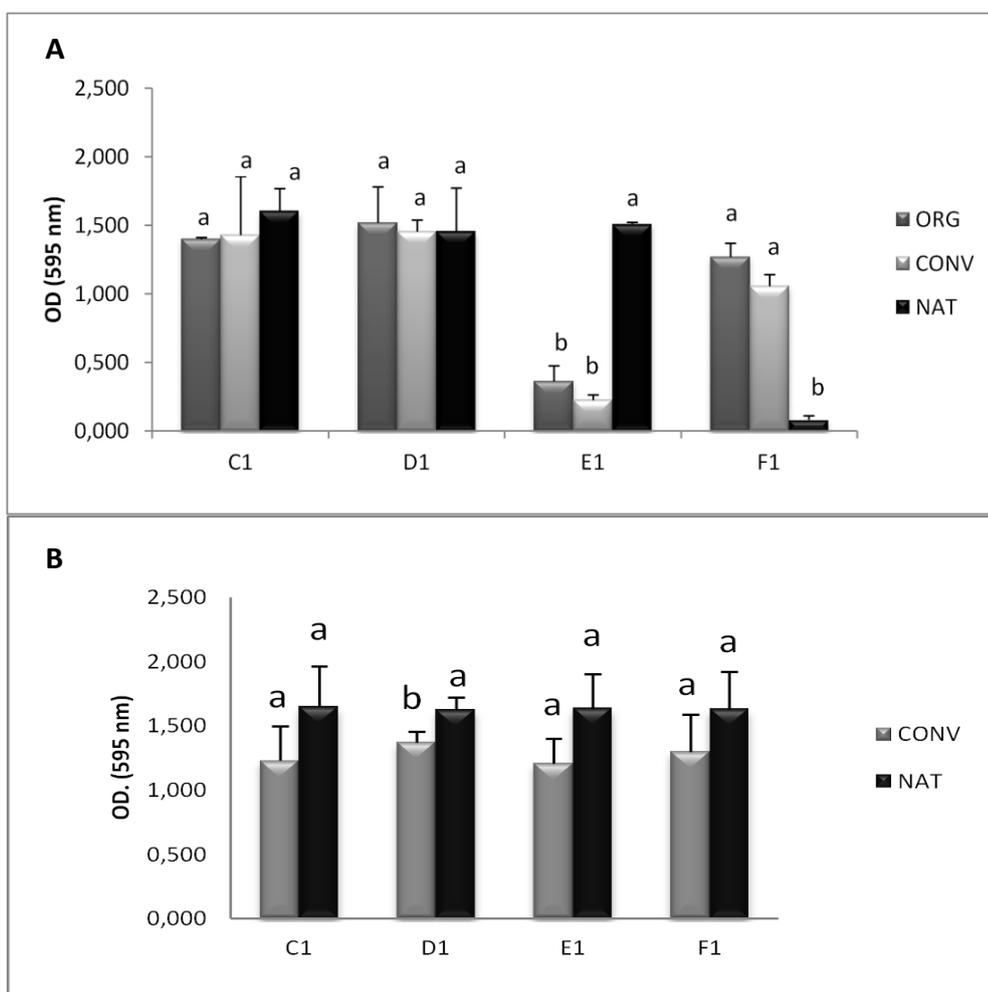
degradável utilizando *Candida tropicalis*. Em contrapartida ZHANG e ZHU (2012), mostram os efeitos de Tween 80 sobre a remoção, sorção e biodegradação de pireno por *Klebsiella oxytoca* demonstrou o aumento da degradação pelas células bacterianas, mostrando uma potencial utilização desse surfactante em biorremediação de solos contaminados, reforçando que micro-organismos do solo conseguem degradar tais compostos.

Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos formados a partir da transformação da cadeia linear de amido em moléculas cíclicas pelas enzimas ciclodextrinase e glucanotransferase. Um dos principais produtos destas enzimas é a  $\alpha$ -ciclodextrina, formada por 6 resíduos de D(+) glicopirranose unidos por ligações  $\alpha$  (1-4), apresentando uma cavidade hidrofóbica e a superfície hidrofílica, devido a presença de grupos OH (KOLLENGODE; HANNA, 1997). A reação biológica para síntese de ciclodextrina não é clara. É concebível que algumas bactérias desenvolveram a capacidade de produção e também enzimas hidrolisantes que permitem as ciclodextrinas serem utilizadas como um meio de armazenamento externo seguro (BUEDENBENDER; SCHULZ, 2009).

Glicogênio é um homopolissacarídeo ramificado, com ligações  $\alpha$  (1-4) de subunidades de glicose, com cerca de 5% de pontos de ramificação  $\alpha$  (1-6) de subunidades de glicose. O glicogênio é sintetizado em alguns micro-organismos utilizando a enzima glicogênio sintetase, ele está presente em bactérias, fungos e leveduras. O glicogênio sendo um componente de reserva de energia intracelular em micro-organismos é liberado no solo quando ocorre a morte ou degradação celular (EYDALLIN et al., 2007).

A estrutura do glicogênio de leveduras possuem um comprimento de cadeia de aproximadamente 11-12 resíduos de glicose que é formado mediante a limitação de carbono, nitrogênio, fósforo ou enxofre. Em bactérias o comprimento médio das cadeias de glicose é de 8-12 unidades de resíduos de glicose. Nas bactérias esse poliglicano é acumulado em condições de crescimento limitado pela deficiência de nutrientes como nitrogênio, sulfato ou fosfato, com excesso de fonte de carbono disponível (MONTERO et al., 2009). A metabolização de tais substratos ocorre de formas distintas para cada espécie presente no microcosmos. Percebe-se que em leveduras a hidrólise do glicogênio ocorre pela ação das enzimas Glicogênio fosforilase, ela realiza a fosforólise da ligação alfa (1-4) da extremidade não-redutora

do polímero, essa reação libera a glicose na forma de glicose-1-fosfato, essa então é convertida a glicose-6-fosfato pela ação da fosfoglicomutase. A glicose-6-fosfato então pode ser utilizada na via da glicólise (NELSON; COX, 2011; DAUVILLÉE et al., 2005) pela glicoamilase que origina diretamente glicose livre. Enquanto que pelas bactérias tais compostos são metabolizados utilizando a enzima Glicogênio fosforilase (GlgP) (que remove unidades de glicose a partir das extremidades não redutoras da molécula de glicogênio) e a enzima desramificadora (GlgX) que participa na degradação de glicogênio durante longos períodos de privação de substrato (DAUVILLÉE et al., 2005; ALONSO-CASAJU'S et al., 2006).



**Figura 5.** Perfil de metabolização de polímeros. Usina Jalles Machado A, Usina Goiasa B. Fontes de Carbono C1- Tween 40, D1- Tween 80, E1-  $\alpha$ -ciclodextrina e F1-Glicogênio. Letras iguais não se diferem estatisticamente.

Como pode ser observado na Fig. 5A e 5B, a fonte  $\alpha$ -ciclodextrina (E1) apresentou um alto índice de metabolização para as amostras de solo nativo e um baixo índice para as amostras de solo sob cultivo orgânico e convencional obtidos da Usina Jalles Machado. Já nas amostras obtidas na Usina Goiasa essa fonte não apresentou diferença entre o manejo e a amostra do solo nativo apresentando um alto índice de metabolização. O mesmo ocorre com a fonte Glicogênio (F1) obtida nas amostras de solo coletadas na Usina Jalles Machado, a amostras de solo nativo apresentou um baixo índice de utilização e as amostras de solo sob cultivo orgânico e convencional um alto índice. No entanto na Usina Goiasa não se observa diferença significativa na metabolização do glicogênio pelos micro-organismos nas amostras de solo estudadas (nativo e convencional).

Sobre a avaliação do perfil da comunidade microbiana em amostras de solo sob rotação de cultura de batata, Larkin (2003) relata que as análises não apresentaram uma tendência na utilização de polímeros, afirmando ainda que esse grupo não foi significativo no estudo de rotação de cultura de batata. Maluche-Baretta (2007) encontrou resultados semelhantes (sem diferença significativa) quando avaliou a capacidade de metabolização da comunidade da floresta nativa frente os reflorestamentos com *Araucaria* e *Araucaria* após queima para o grupo de polímeros.

### **6.2.1.2 Carboidratos**

Os carboidratos são fontes de carbono de grande quantidade energética retida e são as biomoléculas mais abundantes da terra (NELSON; COX, 2011), onde observa-se uma distinção ampla na capacidade metabólica das comunidades microbianas das áreas estudadas.

Na metabolização de carboidratos a comunidade microbiana das amostras de solo obtida na Usina Jalles Machado apresentou perfil metabólico distintos. Os micro-organismos presentes nas amostras do solo nativo foram eficiente em metabolizar as fonte  $\beta$ -metil-D-glicosídeo (A2), D-manitol (D2), N-acetil D-glicosamina (E2) e D-celobiose (G1). Os micro-organismos do solo nativo apresentaram uma baixa eficiência em metabolizar a fonte D-lactose (H1) e não

foram capaz de metabolizar D-xilose (B2) (Fig. 6A). Os micro-organismos da amostra de solo sob cultivo convencional e orgânico também mostraram uma boa eficiência em metabolizar as fontes D-manitol (D2), N-acetil D-glicosamina (E2) e D-celobiose (G1).

A fonte D-lactose (H1) mostrou um bom índice de metabolização para as amostras de solo sob cultivo convencional e orgânico se comparado com as amostras de solo nativo e a fonte  $\beta$ -metil-D-glicosídeo (A2) um baixo índice para ambos os solos. A fonte D-xilose (B2) foi metabolizada exclusivamente pelos micro-organismos do solo sob convencional e a fonte i-Eritritol (C2) foi utilizada de forma semelhante pela comunidade das três amostragens de solo, no entanto com um baixo índice de metabolização.

Na Usina Goiasa os micro-organismos metabolizaram os carboidratos de forma homogênea. As fontes D-xilose (B2), i-Eritritol (C2), D-Manitol (D2), N-acetil D-glicosamina (E2), D-celobiose (G1) e D-Lactose (H1) não mostraram diferenças significativas na metabolização para a comunidade do solo sob cultivo convencional e solo nativo. Como pode ser observada na figura 6B, a única fonte que apresentou diferença significativa na capacidade de metabolização entre a comunidade microbiana do solo sob cultivo convencional e solo nativo foi  $\beta$ -metil-D-glicosídeo (A2).

D-xilose é obtida a partir de materiais lignocelulosídicos, durante a hidrólise de lignocelulose diferentes tipos de açúcares são formados, dentre eles D-glicose, D-galactose, D-manose, D-xilose, L-arabinose. Algumas bactérias, fungos e leveduras são capazes de assimilar e fermentar xilose para produzir xilitol, etanol e outros componentes (WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998). Durante a metabolização da D-xilose a mesma passa por duas etapas de oxi-redução sendo convertida a xilitol e posteriormente a xilulose, a qual sofre uma fosforilação para xilulose 5-fosfato que será metabolizada na via das fosfopentoses originando frutose-6 fosfato e gliceraldeído-3-fosfato, esses compostos serão metabolizados na glicólise sendo levados à piruvato, que podem ser oxidados no ciclo do ácido cítrico ou fermentado a etanol (WEEB; LEE, 1990).

Eritritol é obtido partir de sacarose por transformação microbiana e/ou enzimática da sacarose. O eritritol ou eritrol é um poli álcool composto de quatro

carbonos que serve como fonte de energia para alguns micro-organismos, É encontrado em frutas, cogumelos e alguns alimentos fermentados (SASAKI, 1989). Alguns micro-organismos como as brucelas não metabolizam diretamente o eritritol, mas sim a eritrose, açúcar simples resultante do desdobramento da eritrose, que é um subproduto do eritritol. A enzima envolvida no processo catabólico do eritritol é a D-eritrose-1-fosfato desidrogenase (SARGARI et al., 2000).

Manitol é um álcool açúcar que ocorre naturalmente com seis átomos de carbono. Está presente em diversas frutas, vegetais e algas e pode ser produzido por vários fungos e bactérias, a bactéria *Leuconostoc mesenteroides* utiliza a enzima manitol desidrogenase para formar manitol a partir de frutose (KORAKLI; VOGEL, 2003; EGGLESTON; LEGENDRE; TEW, 2004). É o álcool açúcar mais largamente distribuído na natureza, e tem sido relatado em mais de 100 espécies de plantas vasculares, incluindo muitas horticulturas e importantes culturas agrônômicas (JOHAN; JOHN; MASON, 1996). Na degradação do manitol a enzima Manitol desidrogenase (MDH) é usada para converter manitol a frutose pela enzima manitol desidrogenase na presença da co-enzima NAD<sup>+</sup>, com formação no final da reação de frutose, NADH e H<sup>+</sup>.

Niimi et al., (1986) em trabalho de regulação do catabolismo de manitol em *Cândida albicans*, verificou que o crescimento em uma mistura de glicose e manitol, a utilização do manitol ocorreu apenas após o esgotamento da glicose, concluindo que concentrações mesmo que diminutas de glicose podem inibir a degradação do manitol. Como no sistema Biolog EcoPlate não se observa a presença de glicose juntamente com os substratos presentes, verifica-se a utilização do manitol pela comunidade microbiana avaliada de forma eficiente.

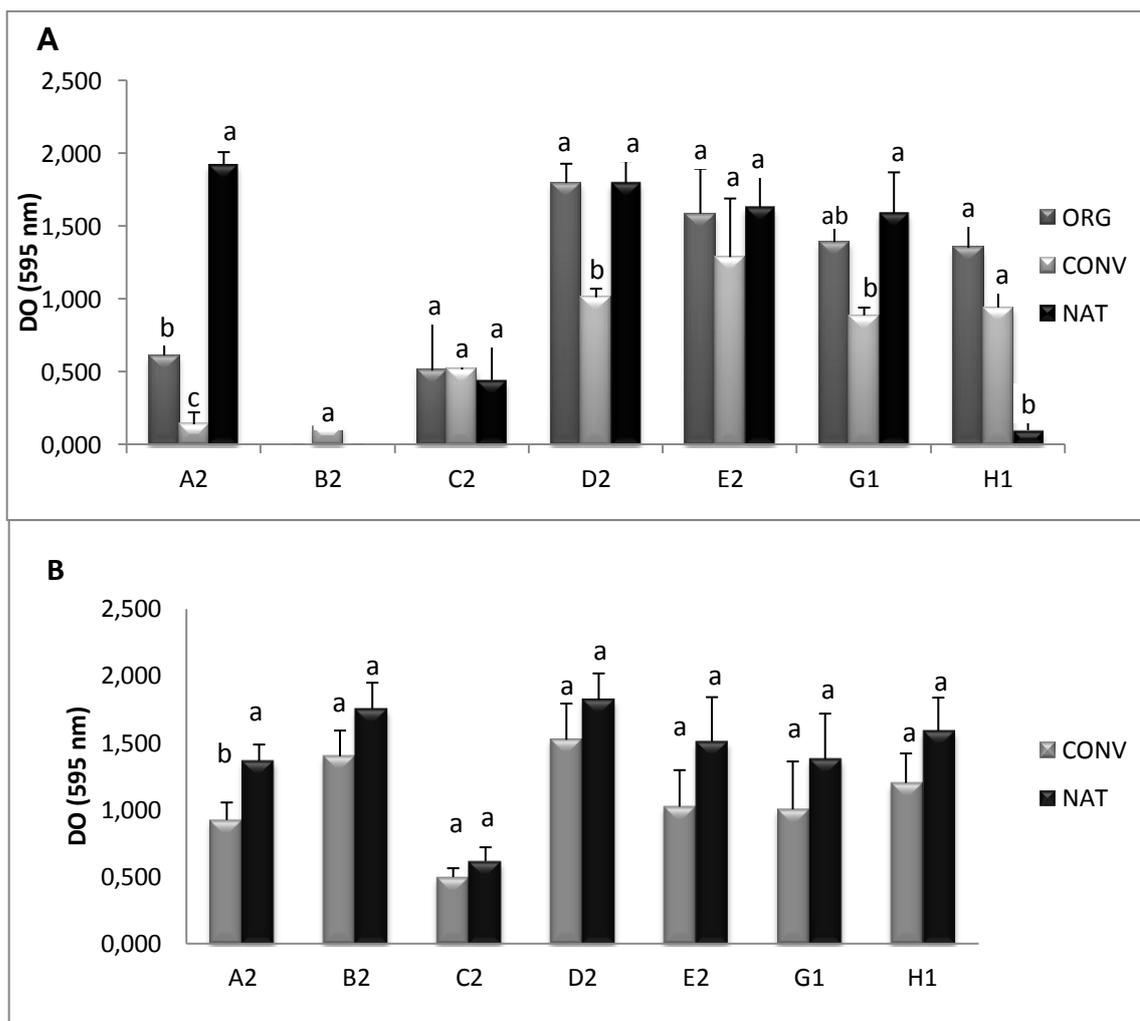
N-acetil-D-glicosamina é derivada de glicosamina que é um componente da parede celular de bactérias e fungos (SALOMO; MÜNCH; RÖSKE, 2009). A parede celular de bactérias é constituída de peptídeoglicano que é formado por polímero constituído de N-acetilglicosamina e Ácido N-acetil-murâmico. A glicosamina pode ser acetilada para formar N-acetilglicosamina, sendo utilizada na produção de endotoxinas em bactérias e também são utilizadas na constituição de quitina. A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose, sendo um dos principais componentes da parede celular de fungos (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

A degradação de celulose envolve a produção de celobiose por meio de exocelobiohidrolases e endoglucanases, a conversão de celobiose para glicose ocorre por meio das enzimas  $\beta$ -glicosidases. As enzimas Glucanases e  $\beta$ -glicosidases apresentam um importante papel de degradação dos produtos da celulose na natureza (MARASCO; LAGO; FELICE, 1995), essa degradação é de grande interesse para a realização do ciclo de decomposição da matéria orgânica e disponibilização de nutrientes para as plantas. A ação da comunidade microbiana quanto à degradação dos derivados de celulose apresenta resultados surpreendentes em todas as áreas de cultivo testadas, bem como nas áreas de cerrado nativo.

Lactose é um açúcar presente no leite de muitos mamíferos. É um dissacarídeo formado de galactose e glicose e é quimicamente definido como O- $\beta$ -D-galactopiranosil-(1-4)- $\beta$ -D-glicose,  $C_{12}H_{22}O_{11}$  (GÄNZLE; HAASE; JELEN, 2008). A habilidade de alguns micro-organismos em metabolizar lactose é resultado da presença das enzimas lactose permease e  $\beta$ -galactosidase, (RUBIO-TEIXEIRA, 2005).  $\beta$ -galactosidase hidroliza lactose em glicose e galactose. A Glicose intracelular pode entrar na via metabólica da glicólise enquanto galactose segue a via de Leloir. O metabolismo da lactose e galactose são intimamente relacionadas (RUBIO-TEIXEIRA, 2005; GUIMARAES; TEIXEIRA; DOMINGOS, 2010).

A fonte  $\beta$ -metil D-glicosídeo (A2) foi convertido de forma mais eficiente pela comunidade do solo nativo, enquanto os micro-organismos dos outros tipos de manejo não foram capazes de metabolizar esse composto de forma eficiente (Fig. 6A e 6B).

A fonte D-xilose (B2), obtido das amostras de solo da Usina Jalles Machado, apresentou um baixo índice de metabolização pela comunidade microbiana do solo convencional, nos demais solos não houve metabolização deste substrato. No entanto na Usina Goiasa essa fonte apresentou um alto índice tanto para os solos convencional e nativo. A fonte i-Eritritol (C2) apresentou um baixo índice para os solos testados nas duas usinas.



**Figura 6.** Perfil da metabolização de Carboidratos. Usina Jalles Machado - A, Usina Goiasa - B. Fontes de carbono A2-  $\beta$ -Metil-D-Glicosídeo, B2- D-Xilose, C2-i-Eritritol, D2- D-Manitol, E2- N-Acetil-D-Glicosamína, G1- D-celobiose e H1  $\alpha$ -D-Lactose. Letras iguais não se diferem estatisticamente.

Na avaliação de rotações de culturas em plantações de batata em um período de 3 anos, Larkin (2003) relatou que os carboidratos apresentaram uma maior metabolização nas rotações soja/milho/batata e batata sem rotação do que nas rotações soja/cevada/batata e cevada/trevo/batata. No entanto a maior utilização dos carboidratos foi observada na rotação soja/milho/batata.

Maluche-Baretta (2007) na avaliação do grupo dos carboidratos como fonte de C relatou que não houve diferença na utilização de carboidratos da comunidade da floresta nativa de *Araucaria*, com a comunidade do reflorestamento de *Araucaria* e também não houve diferenças da comunidade da floresta nativa com reflorestamento com queima, no entanto houve diferenças significativas na

comunidade do reflorestamento e na comunidade do reflorestamento com queima. De todos os grupos testados os carboidratos foram os que apresentaram maior utilização e essas taxas foram mais pronunciadas na área de floresta nativa de *Araucaria* e na área de reflorestamento com queima.

### **6.2.1.3 Ácidos Carboxílicos**

Os ácidos carboxílicos apresentam o maior número de fontes de C dentre os grupos testados.

Na Usina Jalles Machado os micro-organismos do solo nativo foram os mais eficientes em metabolizar as fontes Ácido D-Galactônico  $\gamma$ -Lactona (A3) e Ácido 4-Hidroxi Benzoico (D3) e também foram capazes de metabolizar a fonte Ácido 2-Hidroxi Benzoico (C3) enquanto as comunidades presentes nas demais amostras de solos não foram capazes de utilizar essa fonte de carbono.

As fontes Ácido D-Galacturônico (B3), Ácido  $\gamma$ -Hidroxi-butírico (E3), Ácido  $\alpha$ -cetobutírico (G3) e Ácido D-Málico (H3) não apresentaram diferenças significativas na metabolização entre as amostras de solo estudadas, no entanto as fontes Ácido D-Galacturônico (B3) e ácido D-Málico (H3) tiveram um maior índice de utilização. A fonte Ácido D-Glucosamínico (F2) teve maior utilização pela comunidade microbiana presente na amostra de solo nativo e solo sob cultivo orgânico e a fonte Ácido Itacônico (F3) maior índice de metabolização para a amostra de solo nativo.

Os micro-organismos da amostra presentes no solo sob cultivo convencional e orgânico apresentaram uma baixa metabolização da fonte Ácido D-Galacturônico  $\gamma$ -Lactona (A3). Não apresentaram diferença na metabolização da fonte Ácido 4-hidroxi-benzóico (D3), a fonte Ácido-D-glicosamínico (F2) apresentou menor índice para a amostra de solo sob cultivo convencional e a fonte Ácido Itacônico (F3) para a comunidade do solo sob cultivo orgânico. A fonte Ácido 2-hidroxi-benzóico (C3) não foi metabolizada pela comunidade microbiana dessas duas amostras de solo (Fig. 7A).

Na Usina Goiasa os micro-organismos da amostra de solo sob cultivo convencional e solo nativo não apresentaram diferença na metabolização das fontes

Ácido  $\gamma$ -hidroxibutírico (E3), Ácido-D-Glicosamínico (F2), Ácido Itacônico (F3), Ácido  $\alpha$ -cetobutírico (G3) e Ácido D-málico (H3).

As fontes Ácido D-Galacturônico  $\gamma$ -Lactona (A3) e Ácido D-Galacturônico (B3) foram metabolizadas de forma mais eficiente pelo solo nativo, a fonte Ácido 2-Hidroxibenzóico (C3) foi metabolizada exclusivamente pelo solo sob cultivo convencional e a fonte Ácido 4-Hidroxibenzóico (D3) pelo solo nativo (Fig. 7B).

O Ácido D-Galactônico  $\gamma$ -Lactona é um produto da degradação da D-galactose, várias vias foram descritas para a degradação da D-galactose a partir da via de Leloir, as respectivas enzimas envolvidas nesta via são galactoquinase, uridina difosfato galactose-4-epimerase e galactose-1-fosfato uridil transferase (ELSHAFEI; ABDEL-FATAH, 2001).

Segundo Elshafei e Abdel-Fatah (2001) a oxidação de galactose para galactono- $\gamma$ -lactona ocorre na presença de NAD, seguido pela hidrólise de lactona para ácido galactônico por lactonase. O ácido galactônico formado é desidratado para formar Ácido 2-ceto-3-desoxi-D-galactônico (KDGal), que é fosforilado na presença de adenosina trifosfato (ATP), e da origem a 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogalactonato. Este último composto é então clivado para formar gliceraldeído-3-fosfato e piruvato.

Ácido D-Galacturônico geralmente surge durante a hidrólise enzimática de pectina, diferentes tipos de atividades enzimáticas pectinolítica, hemicelulotíticas e carbohidratases são utilizadas na degradação de pectina. BLAKE e RICHARDS (1968) mostraram que após a hidrólise ácida dos Ácidos D-Galacturônicos ocorre a formação de lactonas. Na presença de lactonase as lactonas podem formar Ácido Galactônico e assim como no metabolismo do Ácido Galactônico  $\gamma$ -lactona ao final da rota ocorre a formação de gliceraldeído-3-fosfato e piruvato.

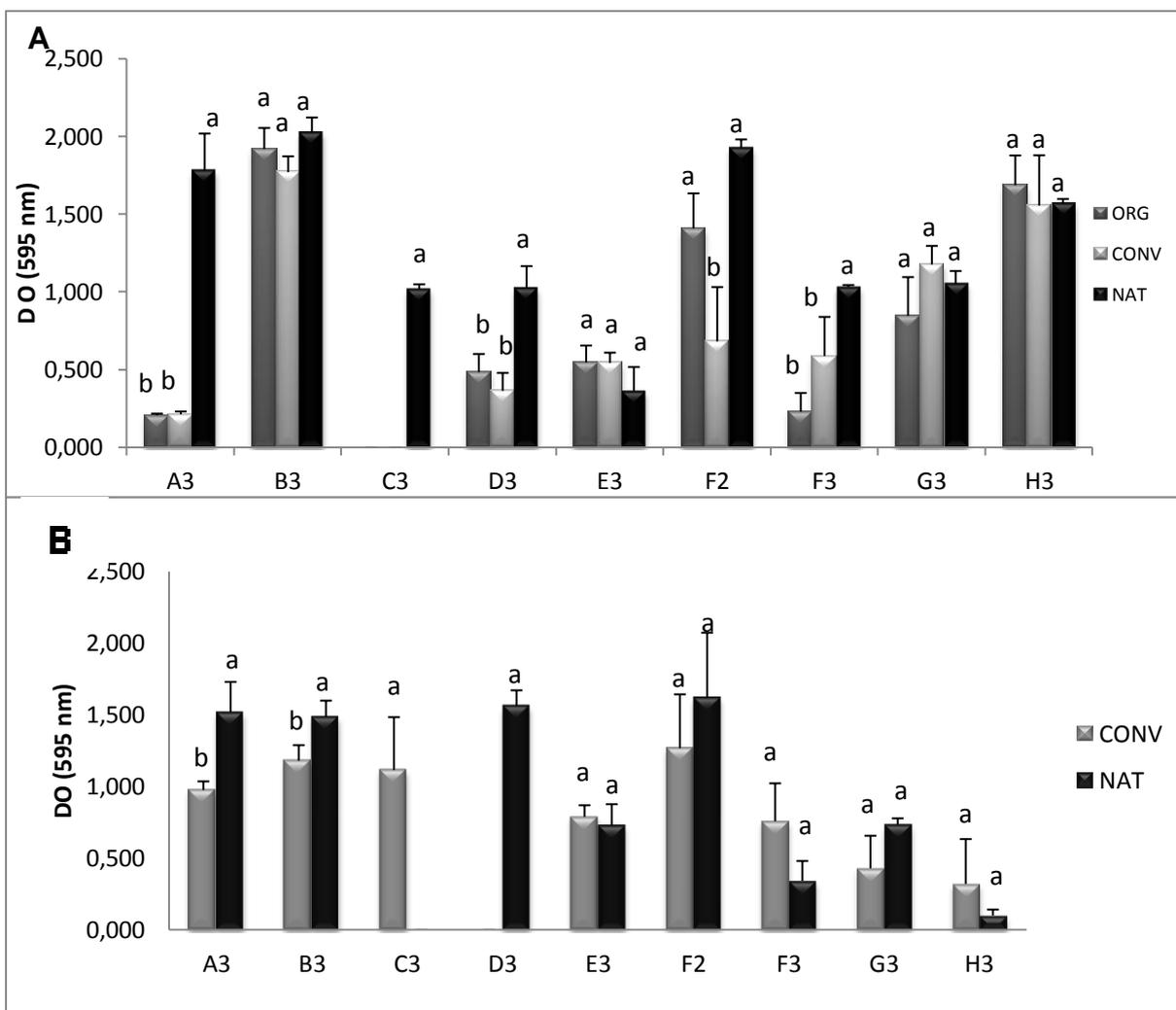
O Ácido D-glicosamínico é um composto formado pela oxidação de D-glicosamina, esse composto tem sido utilizado como material de partida para a síntese assimétrica de vários aminoácidos como o: 4,5,6-trihidroxinorleucina, Lb hidroxihistidina (PEZZOTTI et al 2004). A enzima D-glicosaminato desidratase (GADH), é utilizada na catalise para conversão de Ácido D-glicosamínico (GlcNA) em Ácido 2-ceto-3-desoxi-D-Glicônico e ao final da rota os produtos formados são piruvato, gliceraldeído e amônia. As propriedades enzimáticas de D-glicosaminato

desidratase (GADH) foi primeiro reportada com a purificação da enzima de *Agrobacterium radiobacter* e posteriormente por *Pseudomonas fluorescens* (IWAMOTO et al., 2000).

O Ácido Itacônico é de grande interesse como um intermediário para produção de materiais poliméricos e N-substituídos de pirrolidonas. O ácido Itacônico pode ser produzido por meio de açúcares como a glicose e a xilose. KAUTOLA et al., (1990) reportaram a produção de Ácido Itacônico a partir de xilose em células de *A. terreus* imobilizadas em ágar ou alginato e também relataram a produção de Ácido Itacônico por *Aspergillus terreus* utilizando sacarose.

Ácido D-málico, representa um produto sintético que ocorre na natureza apenas como L-enantiômero em frutas verdes como maçãs, uvas ou marmelos. A habilidade de uma cepa de levedura em degradar Ácido D-málico extracelular é dependente da eficiência do transporte de ácido dicarboxílico, bem como a eficiência da enzima málica intracelular (REDZEPOVIC et al., 2003). Em geral a catalise das enzimas málicas é a descarboxilação oxidativa de L-malato e/ou oxaloacetato para piruvato e CO<sub>2</sub> na presença dos cofatores NAD(P)<sup>+</sup> e Mn<sup>2+</sup> ou Mg<sup>2+</sup>. Enzimas málicas exibem um elevado grau de homologia, mas a sua função e regulação metabólica variam entre as diferentes espécies e tipos de tecido (REDZEPOVIC et al., 2003).

Ácidos fenólicos, incluindo o ácido 4-hidroxibenzoico, também são amplamente distribuídos em plantas vasculares. No solo o ácido 4-hidroxibenzoico tem elevada volatilização a partir de superfícies de solos alagados, não se espera que seja um fator importante, porque este composto essencialmente existi como um ânion no meio ambiente. Ácido 4-hidroxibenzoico pode ser facilmente degradado em ambientes de solo e de água com base na sua mineralização rápida, demonstrados em estudos de rastreio tanto em condições aeróbias e anaeróbias, mas é também rapidamente degradado em estudos de microcosmos tanto nas condições aeróbias e anaeróbias utilizando sedimentos aquífero ou sedimento de rio. A hidrólise não se espera que seja um fator ambiental importante, uma vez que este composto não tem grupos funcionais que hidrolisam sob condições ambientais (HSDB, 2012).



**Figura 7.** Perfil de metabolização dos Ácidos Carboxílicos. Usina Jalles Machado - A, Usina Goiasa -B. Fontes de Carbono A3- Ácido D-Galactorônico  $\gamma$ -Lactona, B3- Ácido D-Galacturônico, C3- Ácido 2-hidroxibenzóico, D3- Ácido 4-hidroxibenzóico, E3- Ácido  $\gamma$ -Hidroxibutírico, F2- Ácido D-Glicosamínico, F3- Ácido Itacônico, G3- Ácido  $\alpha$ -Cetobutírico e H3- Ácido D-Málico. Letras iguais não se diferem estatisticamente.

Na metabolização dos Ácidos carboxílicos o Ácido D-Galacturônico  $\gamma$ -Lactona (A3) foi metabolizada de forma mais eficiente nas duas usinas pela comunidade do solo nativo, a fonte Ácido 2-Hidroxibenzóico (C3) foi metabolizada exclusivamente pelos micro-organismos do solo nativo na Usina Jalles Machado e na Usina Goiasa pelos micro-organismos do solo convencional. A fonte Ácido 4-Hidroxibenzóico (D3) teve um maior índice de utilização no solo nativo na Usina Jalles Machado e na Usina Goiasa foi utilizado exclusivamente pela comunidade microbiana presente no solo nativo (Fig. 7A e 7B).

Na avaliação da rotação na cultura de batata, Larkin (2003) descreveu que a menor utilização de ácidos carboxílicos foi encontrado na rotação soja/milho/batata no entanto essa rotação apresentou a maior capacidade de utilização de carboidratos.

Maluche-Baretta (2007) não encontrou diferenças significativas na utilização de ácidos carboxílicos em solos de floresta nativa de *Araucaria* e solos reflorestados com *Araucaria* e solos reflorestados com *Araucaria* com queima.

Brackin et al., (2013) relata em seu trabalho de avaliação da função microbiana em um solo de floresta subtropical e um solo agrícola sob plantio de cana-de-açúcar, que os substratos de alta energia como açúcares e aminoácidos foram mais facilmente metabolizados pelos micro-organismos do solo agrícola, ao passo que os ácidos carboxílicos, ácido úrico e ácido síngico, foram utilizados em uma extensão maior por micro-organismos presentes no solo de floresta.

#### **6.2.1.4 Aminoácidos**

Os aminoácidos são monômeros que formam as proteínas, os aminoácidos primários são 20 e todos são encontrados nas proteínas como alfa-aminoácidos. São formados por um grupo carboxila e um grupo amino, ligados ao mesmo átomo de carbono (o carbono  $\alpha$ ). Diferem entre si por suas cadeias laterais ou grupos R, os quais variam em estrutura, tamanho e carga elétrica e influenciam a solubilidade do aminoácido em água. Os aminoácidos nas moléculas protéicas são sempre L-esterioisômeros (NELSON; COX, 2011).

Nas amostras obtidas na Usina Jalles Machado, observou-se que a fonte L-arginina (A4) foi melhor metabolizada pela comunidade presente no solo orgânico e a menor taxa de utilização foi pela comunidade do solo nativo, L-asparagina (B4) foi melhor metabolizado pela comunidade do solo convencional e a comunidade do solo nativo apresentou menor índice de utilização desse substrato, a fonte Fenilalanina (C4) não apresentou diferença na utilização entre as três comunidades das amostras de solo, L-serina (D4) e L-treonina (E4) foram melhor metabolizados pela

comunidade do solo orgânico e nativo e a fonte Ácido Glicil-L-Glutâmico (F4) apresentou maior índice de metabolização no solo sob cultivo orgânico (Fig. 8A).

Na Usina Goiás todas as fontes L-arginina (A4), L-asparagina (B4), Fenilalanina (C4), L-serina (D4), L-treonina (E4) e Ácido Glicil-L-Glutâmico (F4) foram metabolizadas sem diferenças significativas pela comunidade do solo sob cultivo convencional e solo nativo (Fig. 8B).

L-arginina é um aminoácido semi-essencial que participa em uma importante variedade de atividades bioquímicas e fisiológicas, L-arginina também é um aminoácido classificado com o grupo R carregado positivamente (NELSON; COX, 2011).

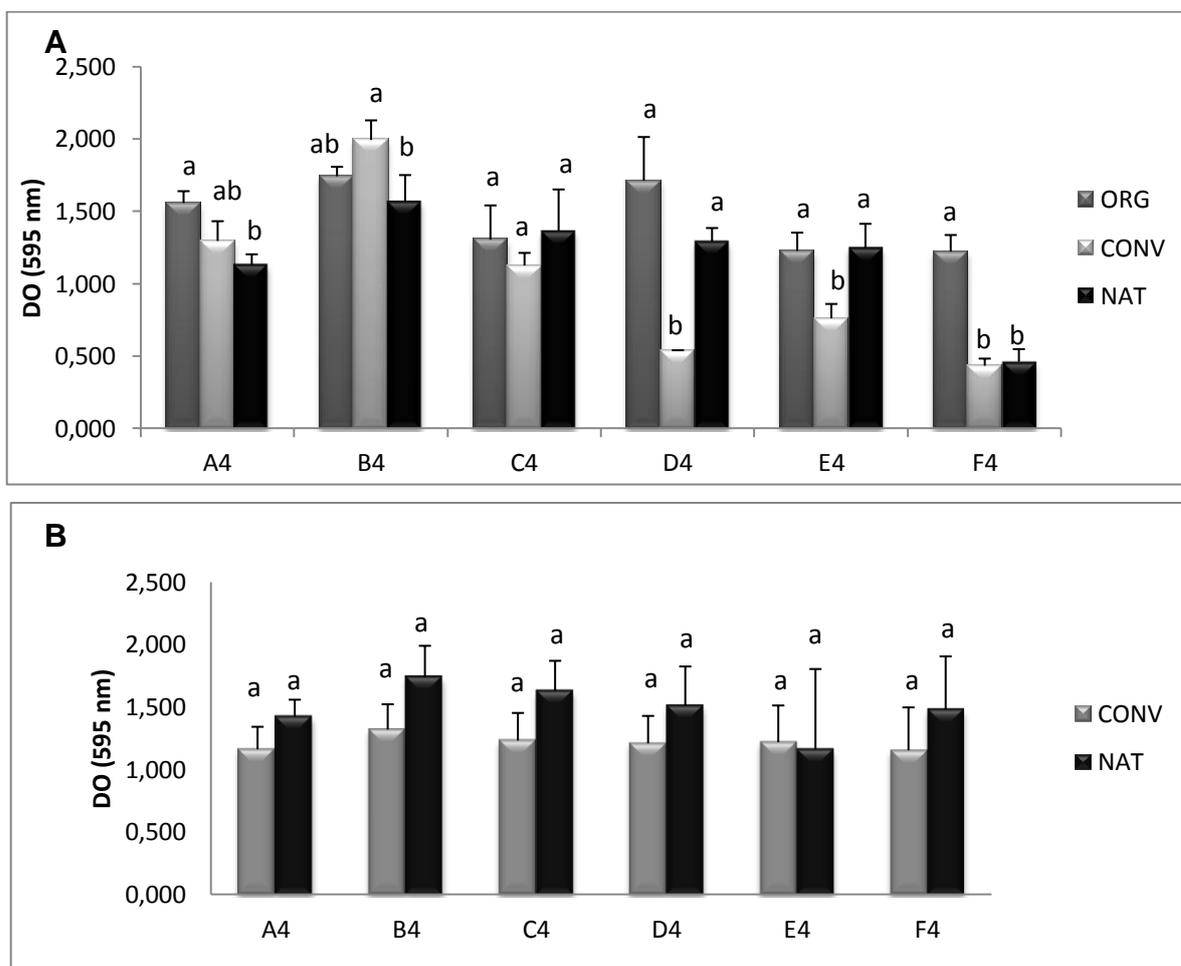
Asparagina é um dos mais comuns dos 20 aminoácidos naturais em organismos vivos. Tem a carboxamida como grupo funcional da cadeia lateral, é um aminoácido não essencial é classificado como um aminoácido com grupo R não carregado, mas polar. O grupo amida é facilmente hidrolisado, convertendo asparagina a ácido aspártico (CONTINEANU et al., 2010; NELSON; COX, 2011). A arginase catalisa a degradação da arginina no solo, liberando  $\text{NH}_4$  que é imobilizada pela comunidade microbiana ativa, ou excretado na solução do solo (OWEN; JONES, 2001). Esse processo tem sido utilizado como medida do N potencialmente mineralizável do solo.

L-fenilalanina pode ser produzido por vários processos químicos e bioquímicos. O processo de produção de L-fenilalanina pela via de bioconversão de ácido fenilpirúvico e ácido L-aspártico utilizando transaminase demonstra ser muito promissor, porque tem elevado rendimento de conversão, no final da conversão o ácido oxalacético é convertido em piruvato e  $\text{CO}_2$  (LENG; ZENG; SUN, 2006).

A L-serina e a L-treonina são aminoácidos que possuem os grupos R não-carregados, mas polar. Os grupos R desses aminoácidos são mais solúveis em água, ou hidrofílicos, que os dos aminoácidos não-polares. A polaridade da serina e da treonina é devido a seus respectivos grupos hidroxilas. Sabe-se que a L-treonina desidratase (TD), assim como L-serina desidratase (SD) catalisam a degradação de L-serina (KUBOTA; YOKOZEKI; OZAKI, 1989). ELLIOTT (1960) foi o primeiro a demonstrar que suspensões de células de *Staphylococcus aureus* eram capazes de metabolizar treonina com a conseqüente produção de aminoacetonas. Foram

identificadas três enzimas que catalisam a degradação de treonina: treonina desidratase, formadora de 2-oxobutirato e  $\text{NH}_4^+$ ; treonina aldolase, produtora de acetaldeído e glicina e treonina desidrogenase, formadora de 2-amino-3-oxobutirato sendo apenas a última de origem mitocondrial.

A conversão de treonina a glicina por Complexo de Clivagem da Treonina (CCT) é dependente de coenzima-A (CoA), ou seja, a abundância de CoA favorece a conversão de treonina a glicina e sua ausência favorece a formação de aminoacetonas (DUTRA; BECHARA, 2005).



**Figura 8.** Perfil de metabolização de aminoácidos. Usina Jalles Machado - A, Usina Goiasa - B. Fontes de Carbono A4- L-Arginina, B4- L-Asparagina, C4- L-Fenilalanina, D4- L-Serina, E4-L-Treonina, F4- Ácido Glicil-L-Glutâmico. Letras iguais não se diferem estatisticamente.

Amostras obtidas na usina Jalles machado, teve a fonte L-asparagina (B4) melhor metabolizada pela solo sob cultivo convencional, enquanto na Usina Goiasa não houve diferença na utilização dessa fonte entre as amostras estudadas. L-

serina (D4) e L-treonina (E4) foram melhor metabolizados pela comunidade do solo sob cultivo organico e solo nativo nas amostras obtidas na Usina Jalles Machado e a fonte (F4) pelo solo sob cultivo orgânico no entanto na usina Goiasa não houve diferença na metabolização dessas fontes pela comunidade nas amostras de solo estudada (Fig. 8A e 8B).

A diferença na degradação dessas fontes foi inusitada, pois L-asparagina, L-serina e L-treonina pertencem ao mesmo grupo de aminoácidos, polares sem carga e possuem estrutura química similar.

Mesmo que esses aminoácidos apresentem características similares tais como cadeias laterais hidrofílicas (polar) e sem cargas os aminoácidos serina e treonina são hidroxilados e pode ser fosforilados pela ação de diversas kinases. A serina por sua vez ainda servirá como doador de carbono ao tetraidrofolato para produzir N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-metileno THF e glicina.

Em estudo de diversidade metabólica utilizando rotação de cultura de batata em um período de 3 anos, Larkin (2003) relatou que os aminoácidos foram mais utilizados na rotações soja/milho/batata e plantação de batata sem rotação do que nas rotações soja/cevada/batata e cevada/trevo/batata.

A diversidade metabólica da comunidade microbiana de solo de floresta nativa de *Araucaria*, solo sob reflorestamento de *Araucaria* e solo sob reflorestamento de *Araucaria* com queima não apresentou diferença significativa para a metabolização do grupo de aminoácidos nas amostras estudadas (MALUCHE-BARETTA, 2007).

#### **6.2.1.5 Amina/Amida**

Na utilização das amina/amida como fonte de carbono pela comunidade microbiana existente nas amostras de solo obtidas na Usina Jalles machado, a fonte Feniletilamina (G4) apresentou o maior indice de metabolização para amostras de solo nativo e a fonte Putrescina (H4) apresentou o maior indice pelos microorganismos das amostras do solo nativo e solo sob cultivo convencional e o menor indice para a amostra do solo sob cultivo orgânico (Fig. 9A).

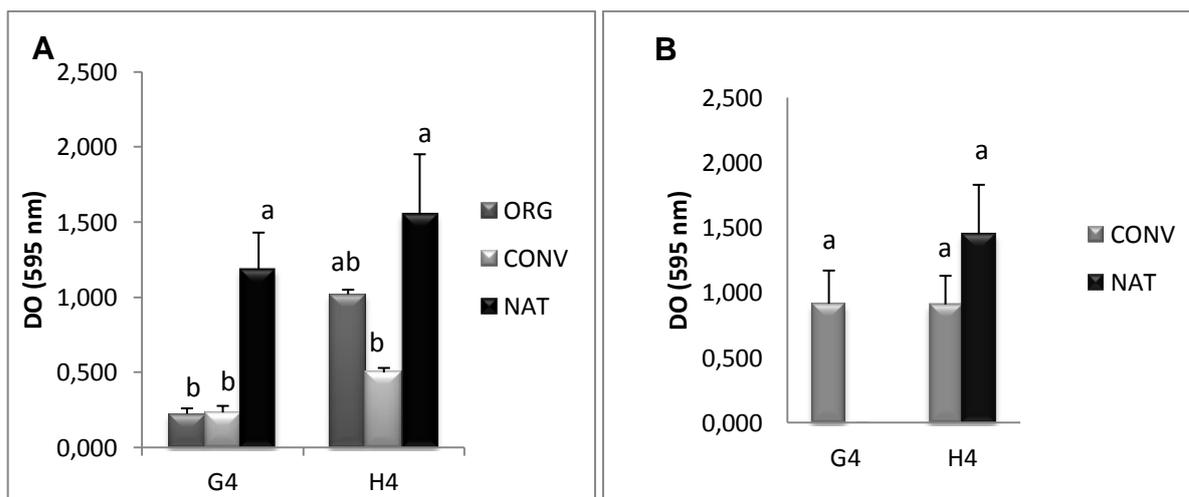
Nas amostras obtida na usina Goiasa, a fonte Feniletilamina (G4) foi metabolizada apenas pelo solo sob cultivo convencional, e o solo nativo não apresentou capacidade de utilização dessa fonte. A Putrescina (H4) não apresentou diferença na utilização pela comunidade das amostras avaliadas neste estudo (Fig. 9B).

A feniletilamina é constituída de um anel benzênico, separado de um grupo amino por átomos de carbono saturados. As aminas biogênicas são formadas durante as fases de transformação dos nutrientes pela ação das enzimas descarboxilases, produzidas por micro-organismos é uma substância de importância para síntese de metabolitos secundários e substâncias de crescimento (MAIJALA et al., 1995).

Putrescina é sintetizada a partir da arginina por arginina descarboxilase e de ornitina por ornitina descarboxilase. Putrescina também pode ser formada por outra via bioquímica, que envolve a desaminação de agmatina. Agmatina pode ser formada pela descarboxilação da arginina como um intermediário na formação de putrescina, isso ocorre por duas reações, na primeira a Agmatina sofre ação da enzima agmatina deiminase com formação de amônia e N-carbamoilputrescina. A N-carbamoilputrescina sofre a ação da enzima N-carbamoilputrescina hidrolase com formação de amônia e putrescina (LANDETE et al., 2008).

O primeiro passo na degradação da putrescina pode ser por uma transaminação oxidativa ou também por uma desaminação oxidativa, catalisada por putrescina oxidase em alguns micro-organismos como *Micrococcus rubens*, *Rhodococcus erythropolis*, incluindo espécies de *Aeromonas* e *Pseudomonas* (BANDOUNAS et al., 2011).

No segundo passo na transaminação/desaminação da putrescina é catalisada por aminobutiraldeído desidrogenase, as duas próximas etapas da degradação da putrescina, envolve as enzimas 4-aminobutirato aminotransferase e succinato-semialdeído desidrogenase, formando succinato ao final da via metabólica. Essa rota de degradação foi descrita para *Pseudomonas putida* por Bandounas et al., (2011).



**Figura 9.** Perfil de metabolização de Amina/Amida. Usina Jalles Machado - A, Usina Goiasa -B. Fontes de Carbono G4- Feniletilamina e H4- Putrescina. Letras iguais não se diferem estatisticamente.

A comunidade microbiana presente nas amostras de solo obtidas na Usina apresentou melhor metabolização da fonte Feniletilamina (G4) para o solo nativo, enquanto que a comunidade presente no solo nativo da Usina Goiasa não foi capaz de metabolizar tal substrato. A comunidade microbiana das amostras de solo nativo e solo sob cultivo convencional obtido na Usina Jalles Machado apresentou diferença na utilização da fonte Putrescina (H4) e na Usina Goiasa essa fonte não apresentou diferença significativa na utilização pela comunidade entre as amostras de solos testadas.

Larkin (2003) avaliando o plantio por rotação da cultura de batatas relatou ter observado uma maior utilização do grupo das aminas na rotações soja/milho/batata e plantação de batata sem rotação do que nas rotações soja/cevada/batata e cevada/trevo/batata.

Na avaliação do grupo das amina/amidas Maluche-Baretta (2007) não encontrou diferença significativa na metabolização desse grupo para solo sob floresta nativa de *Araucaria*, solo com reflorestamento e solo com reflorestamento e queima de *Araucaria*.

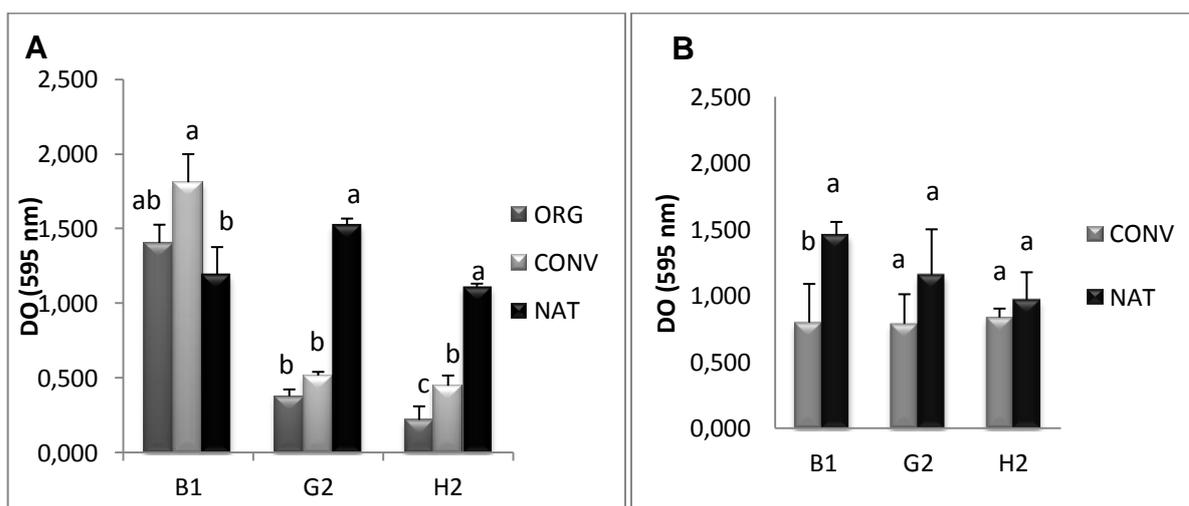
### 6.2.1.6 Miscelâneas

Na utilização de miscelâneas como fonte de C pela comunidade microbiana existente nas amostras de solo obtidas na Usina Jalles Machado a fonte Éster metílico do ácido pirúvico (B1) foi melhor metabolizado pela comunidade das amostras de solo sob cultivo convencional e o solo nativo apresentou o menor índice de metabolização. As fontes Glicose-1-fosfato (G2) e D,L- $\alpha$ -Glicerol Fosfato (H2) foram melhor metabolizadas pelos micro-organismos do solo nativo (Fig. 10A).

Para a Usina Goiasa observou-se o maior índice de metabolização da fonte Éster metílico do ácido pirúvico (B1) pela comunidade microbiana do solo nativo, enquanto que as fontes Glicose-1-fosfato (G2) e D,L- $\alpha$ -Glicerol Fosfato (H2), não apresentaram diferença na metabolização pela comunidas (Fig. 10B).

Glicose-1-fosfato é convertida por fosfoglucomutase a glucose-6-fosfato que é catalisada no ciclo glicolítico para piruvato (ELSHAFEI; ABDEL-FATAH, 2001).

Os produtos da metabolização dos compostos do grupo miscelâneas vão originar substratos da via glicolítica tais como di-idroxiacetono fosfato e piruvato.



**Figura 10.** Perfil de metabolização de Miscelânias. Usina Jalles Machado - A, Usina Goiasa - B. Fontes de Carbono B1- Éster metílico do ácido pirúvico, G2- Glicose-1-fosfato e H2- D,L- $\alpha$ -Glicerol Fosfato. Letras iguais não se diferem estatisticamente.

Observou-se uma diferença na metabolização do Éster metílico do ácido pirúvico (B1) entre as amostras de solo obtidas nas duas áreas estudadas. Nas amostras do solo sob cultivo convencional obtido na Usina Jalles Machado observou um maior índice de utilização enquanto que nas amostras obtidas na Usina Goiás o maior índice foi observado na comunidade do solo nativo. As fontes Glicose-1-fosfato (G2) e D,L- $\alpha$ -Glicerol Fosfato (H2) apresentaram maior metabolização pela comunidade presentes nas amostras de solo nativo obtidas na Usina Jalles Machado e nas amostras coletadas na Usina Goiás não houve diferença na utilização dessas fontes (Fig. 10A e 10B).

Larkin (2003) relatou o perfil da comunidade microbiana presente nas amostras de solo no cultivo de batatas não apresentaram diferença significativa frente a capacidade de metabolização do grupo das micelâneas.

Maluche-Baretta (2007) também relata que não houve diferença significativa na utilização do grupo das miscelâneas pela comunidade do solo da floresta nativa de *Araucaria*, do reflorestamento de *Araucaria* e do reflorestamento com queima.

Chen et al., (2013) relata que foram observadas mudanças significativas na estrutura e na atividade metabólica da comunidade microbiana de solo de vegetação nativa de *Pinus massoniana* para plantações de *Eucalyptus exotic*. A conversão do solo diminuiu a função metabólica por meio de mudanças na composição da vegetação e da disponibilidade de recursos do solo: C, N e umidade.

Huang et al., (2012) indicou que a salinização secundária de solo teve efeitos importantes sobre a comunidade microbiana. Os quatro grupos (Carboidratos, Diversos, Aminoácidos e Polímeros) refletiram a maioria das informações sobre utilização de fontes de carbono e que os microrganismos que metabolizaram esses grupos eram mais vulneráveis ao nitrato. Chen et al., (2013) demonstrou que a conversão de plantações nativas *P. massoniana* para plantações de eucalipto alterou significativamente a composição da comunidade microbiana e que a conversão do solo diminuiu a função metabólica através de mudanças na composição da vegetação. Larkin (2003) observou que no período de 3 anos na rotação de cultura da batata, quando ocorreu a rotação com cevada, milho ou soja foram observados perfis metabólicos mais vantajosos do que na plantação de batata sem rotação de cultura e Maluche-Baretta (2007) relatou que os diferentes estados

de conservação das florestas de Araucária (nativa e reflorestadas) influenciaram na capacidade metabólica funcional das áreas, com a utilização global de fontes substratos de C maior na área de floresta nativa e com menor capacidade nas áreas de reflorestamento e reflorestamento com queima de Araucária.

### *6.3 ANÁLISE DOS COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) DA UTILIZAÇÃO DAS FONTES DE CARBONO PELA COMUNIDADE MICROBIANA DAS USINAS JALLES MACHADO E GOIASA.*

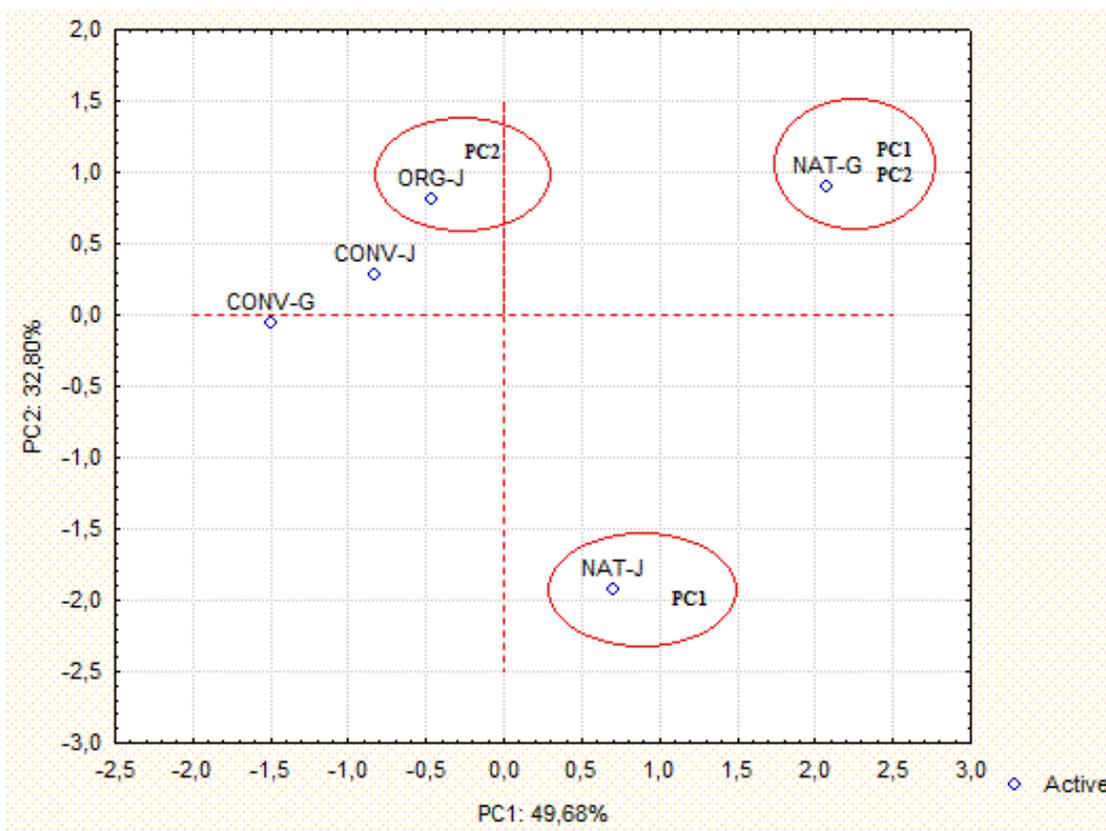
A análise de componentes principais (Principal Component Analysis) PCA é um método estatístico de múltiplas variáveis que tem por finalidade reduzir os dados analisados, eliminando sobreposições e fazendo a escolha de formas mais representativas de dados a partir de combinações lineares das variáveis originais (MARTENS; NAES, 1989).

Para investigar como as diferentes áreas em estudo foram relacionadas com base na utilização de fontes de carbono, os valores de absorvância foram analisados por meio da PCA para os seis grupos (polímeros, carboidratos, ácidos carboxílicos, aminoácidos, amina/amidas e miscelâneas), contidos no sistema Biolog ECOPLATE.

Os componentes principais extraídos foram aqueles que apresentaram autovalores maiores que 1. As análises realizadas para os seis grupos, frente a utilização das fontes de carbono, amostraram que todas as fontes apresentaram dois componentes principais, PC1 e PC2 com autovalores maiores que 1, exceto os ácidos carboxílicos que apresentaram 3 componentes principais. Utilizando os dois maiores componentes principais e tendo PC1 e PC2 como eixo das ordenadas, a pontuação das diferentes áreas foi usada para traçar um mapa de coordenadas. Desta forma foram formadas as figuras das análises de componentes principais da utilização das fontes de carbono pelas comunidades microbianas dos solos, sob diferentes manejos.

### 6.3.1 PCA Polímeros

A análise do índice de desenvolvimento de cor dos polímeros (Fig. 11) resultou em dois componentes principais para esta classe.



**Figura 11** - Polímeros: gráfico da PCA com primeiro e segundo componente principal das amostras NAT-G (solo nativo da Usina Goiás), CONV-G (solo convencional da Usina Goiás), NAT-J (solo nativo da Usina Jalles), ORG-J (solo orgânico da Usina Jalles) e CONV-J (solo convencional da Usina Jalles) baseados nos valores de absorvância do Biolog EcoPlate.

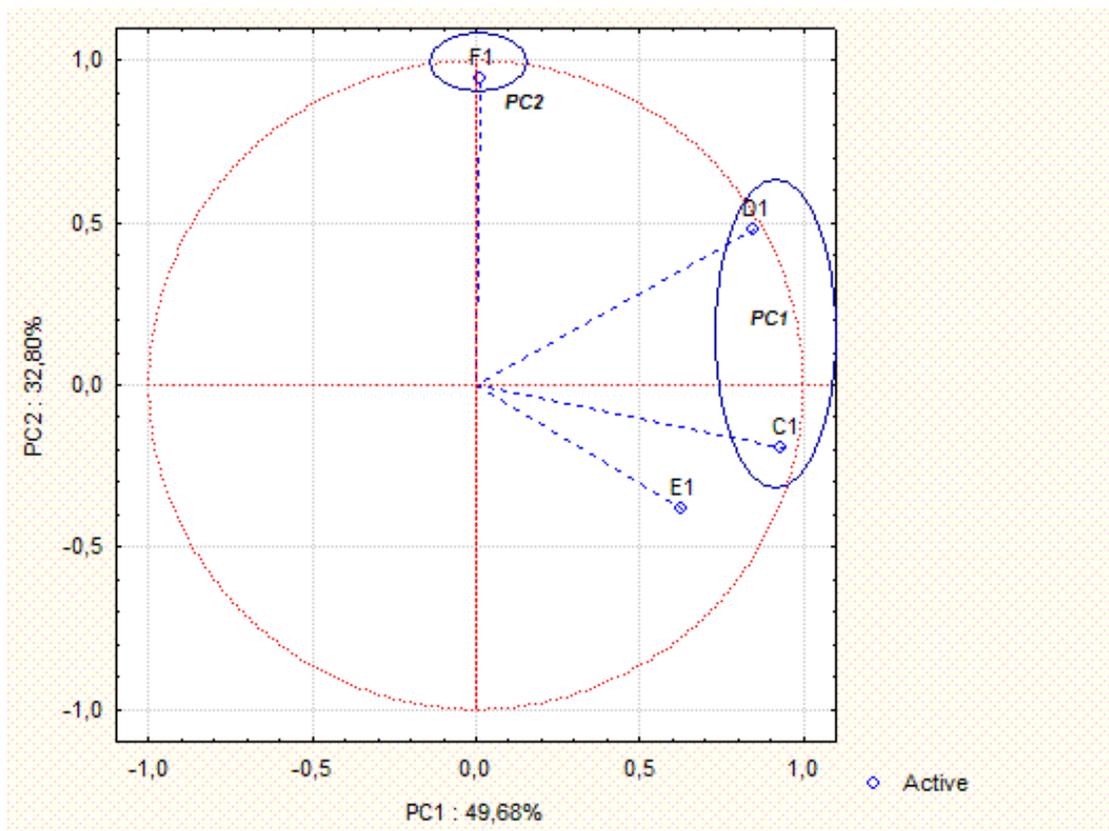
Como pode ser observada na figura 11 a comunidade microbiana presente nos solos de cultivo de cana-de-açúcar (convencional e orgânico), bem como no solo controle (nativo) coletado tanto na Usina Jalles Machado como na Usina Goiás, foram responsáveis por 49,68% da variância no Componente Principal 1 (PC1) e 32,80 % de variância no PC2, totalizando 82,48% da variância total (PC1 e PC2).

As amostras de solo identificadas como solo nativo coletado na usina Jalles Machado (NAT-J) e solo nativo coletado na usina Goiás (NAT-G) são explicados pelo PC1, ou seja, explicam 49,68% da variância dos dados. Frente a análise dos componentes principais as amostras de solo nativo foram diferentes das demais amostras de solo referente aos manejos de cana-de-açúcar, i.e. do solo coletado de manejo orgânico na usina Jalles Machado (ORG-J), solo coletado de manejo convencional na usina Jalles Machado (CONV-J) e solo coletado de manejo convencional na usina Goiás (CONV-G). As amostras NAT-G e ORG-J são explicados pelo PC2 (32,80%), os quais foram diferentes das outras amostras de manejos dos solos (NAT-J, CONV-G e CONV-J). De acordo com a análise de componentes principais a amostra NAT-G possui seus dados explicados por PC1 e PC2, totalizando 82,48% da variância total.

A figura 12 evidencia as fontes de carbono que apresentaram maior metabolização, frente aos componentes principais de maior importância durante a análise, retratando evidenciando neste trabalho PC1 e PC2. Como podem ser observadas as fontes D1-Tween 80 e C1-Tween 40 (PC1) apresentaram maior índice de metabolização pela comunidade microbiana presente no solo nativo nas duas áreas de coleta (Usina Goiás e Usina Jalles Machado) e a fonte F1-Glicogênio (PC2) apresentou maior metabolização pela comunidade do solo nativo na área de coleta referente à Usina Goiás, além da comunidade microbiana do solo em cultivo orgânico coletado na Usina Jalles Machado.

Durante a utilização de polímeros como fonte de carbono, foi possível observar que a comunidade microbiana presente no solo nativo nos diferentes pontos de coleta apresentou maior capacidade de metabolização quando comparado, com os demais tipos de manejos estudados para este grupo de fontes de carbono.

Em estudo realizados com o intuito de verificar os efeitos da salinização secundária (aplicação de nitrato) na diversidade funcional microbiana em solos no território Chinês, Huang et al., (2012), mostrou que as fontes de carbono classificadas como polímeros, carboidratos, miscelâneas e aminoácidos foram significativamente correlacionadas em dois componentes principais PC1 e PC2 nas amostras de solo estudadas e que esses grupos puderam refletir a maioria das informações.

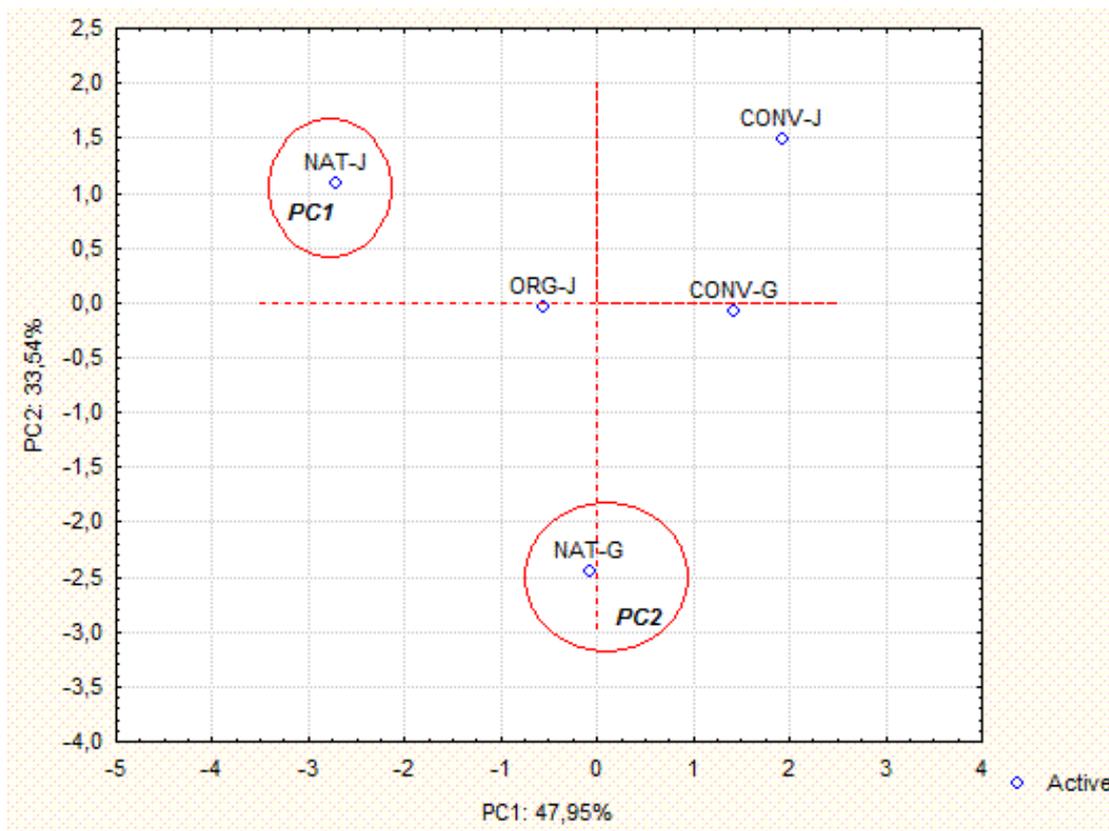


**Figura 12** – Polímeros: PCA dos dois primeiros componentes principais para as fontes C1- Tween 40, D1- Tween 80, E1-  $\alpha$ -ciclodextrina e F1-Glicogênio, com base nos valores de absorvância do Biolog EcoPlate.

Maluche-Baretta (2007) no estudo da diversidade microbiana em solos sob florestas de *Araucária angustifolia*, relatou que na análise de componentes principais a área de reflorestamento apresentou uma forte associação com o grupo de polímeros e a área de floresta nativa de *Araucária* não se associou a nenhum grupo na análise, ela descreveu que a comunidade da floresta nativa de *Araucária* possui uma estrutura mais dinâmica, capaz de utilizar diferentes grupos de substratos e que as demais áreas apresentaram um potencial fisiológico mais restrito.

### 6.3.2 PCA Carboidratos

A figura 13 permite visualizar a utilização dos carboidratos como fonte de carbono, que resultou em dois componentes principais PC1 e PC2.



**Figura 13** - Carboidratos: gráfico da PCA com primeiro e segundo componente principal das amostras NAT-G (solo nativo da Usina Goiasa), CONV-G (solo convencional da Usina Goiasa), NAT-J (solo nativo da Usina Jalles), ORG-J (solo orgânico da Usina Jalles) e CONV-J (solo convencional da Usina Jalles) baseados nos valores de absorvância do Biolog EcoPlate.

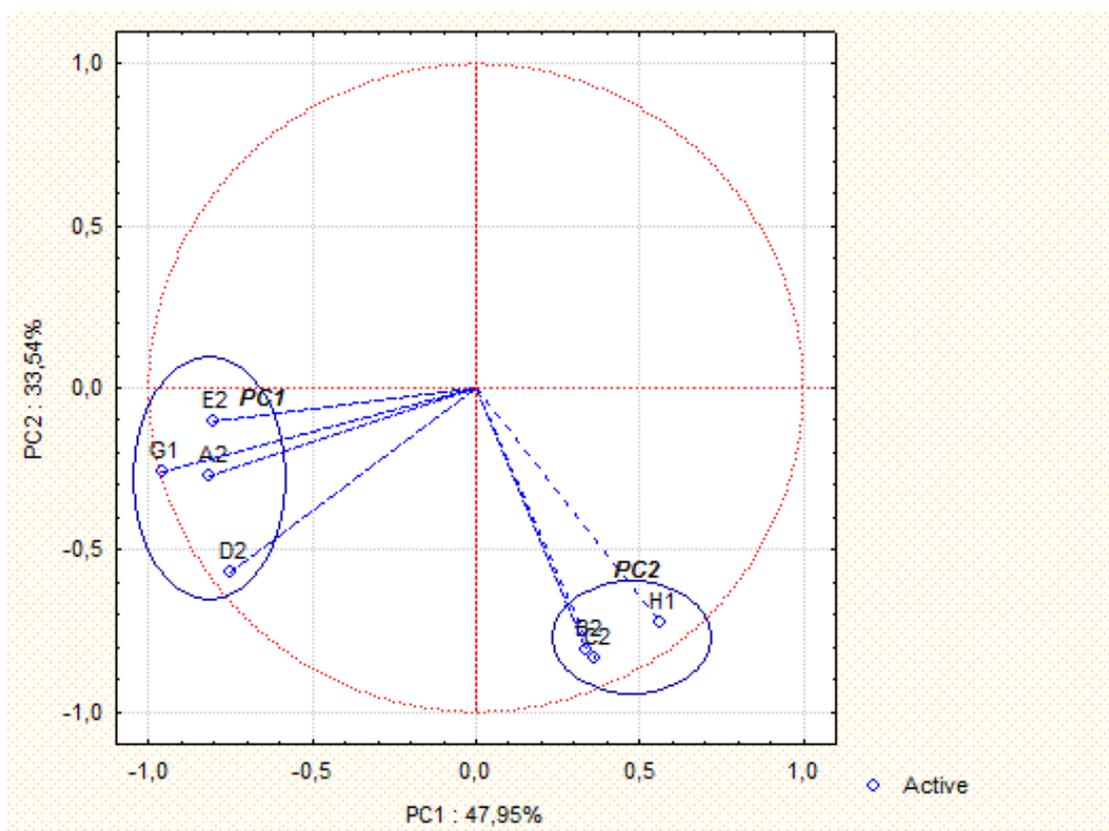
Como pode ser observado na figura 13, dois componentes principais foram extraídos da análise e contribuíram com 81,49% da variância total. O primeiro componente principal (PC1) é explicado por 47,95% da variância e o segundo componente principal (PC2) é explicado por 33,54% da variância.

A amostra de solo NAT-J é explicada pelo PC1, ou seja, explica 47,95% da variância dos dados. É possível observar que a amostra NAT-J foi diferente das demais amostras de solo sob manejo convencional e orgânico e do solo NAT-G. A amostra NAT-G é explicada pelo PC2 (33,54%), a qual foi diferente das demais amostras de solo (NAT-J, CONV-G, CONV-J e ORG-J).

Segundo Brackin et al., (2013) em seu trabalho de avaliação da função microbiana em floresta adjacente subtropical (*Eucalyptus*) e solo de agricultura de cana-de-açúcar e soja, relatou que em solos sob a agricultura de cana-de-açúcar e

soja ocorreu a proliferação de grupos microbianos que usavam substratos de alta energia como os carboidratos (glicose, sacarose e frutose).

A Figura 14 mostram as fontes de carbono que apresentaram maior metabolização, representadas pela PC1 e as fontes representadas pela PC2. Como pode ser observado as fontes A2- $\beta$ -Metil-D-Glicosídeo, D2-D-Manitol, E2-N-Acetil-D-Glicosamína e G1-D-celobiose (PC1) apresentaram maior índice de metabolização pela comunidade do solo nativo da Usina Jalles Machado e as fontes B2- D-Xilose, C2-i-Eritritol e H1-  $\alpha$ -D-Lactose (PC2) apresentaram maior metabolização pela comunidade do solo nativo da Usina Goiasa.



**Figura 14** - Carboidratos: PCA dos dois primeiros componentes principais para as fontes A2- $\beta$ -Metil-D-Glicosídeo, B2- D-Xilose, C2-i-Eritritol, D2- D-Manitol, E2- N-Acetil-D-Glicosamína, G1- D-celobiose e H1  $\alpha$ -D-Lactose, com base nos valores de absorvância do Biolog EcoPlate.

Xue-mei et al., (2007) estudando os efeitos do tipo de vegetação na estrutura da comunidade microbiana do solo e na diversidade catabólica relatou que as fontes de carbono B2 (D-Xilose), A2 ( $\beta$ -Metil-D-Glicosídeo), D2 (D-Manitol) e E2 (N-

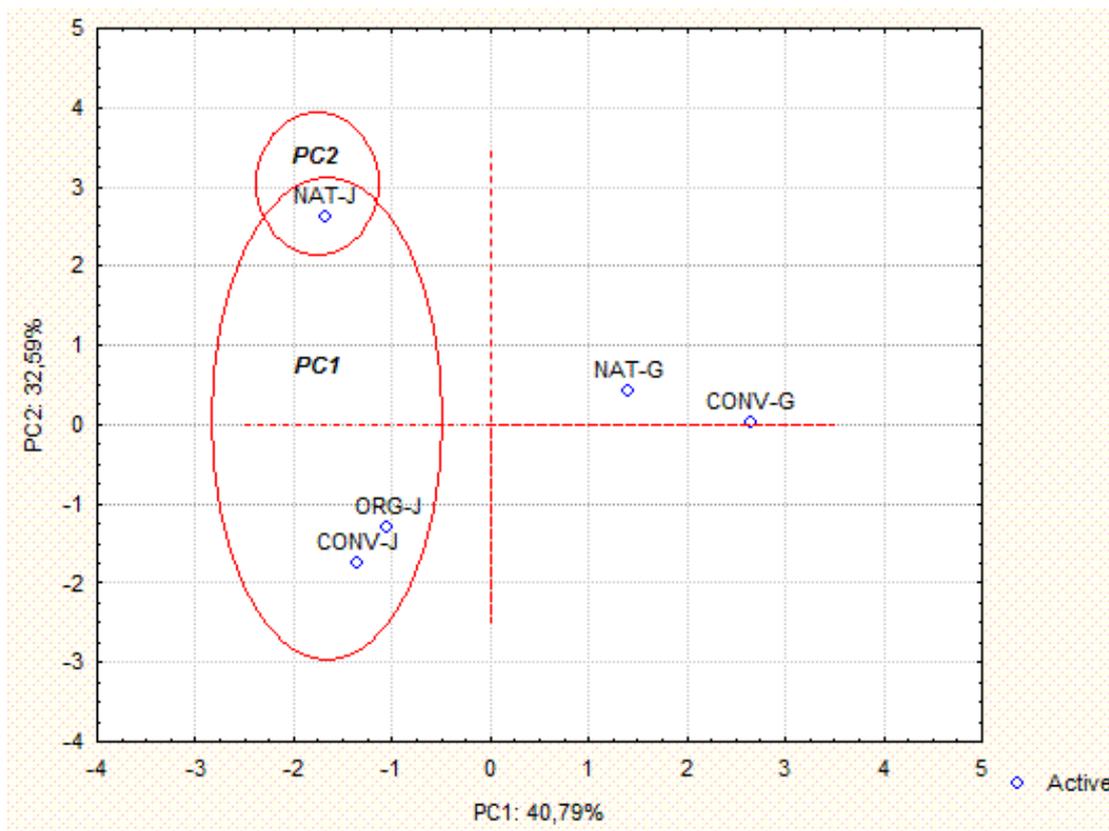
Acetil-D-Glicosamína) apresentaram maior metabolização pela comunidade microbiana do solo sob campo de soja, sob plantação de arbusto artificial e sob arbusto natural e que a comunidade sob relva artificial e campo de milho apresentaram uma capacidade de metabolização inferior para essas fontes. Nossos dados mostram que as fontes B2 (D-Xilose), A2 ( $\beta$ -Metil-D-Glicosídeo), D2 (D-Manitol) e E2 (N-Acetil-D-Glicosamína) estavam correlacionados com o solo nativo obtido nos dois pontos de coleta.

Estudos relacionam a maior utilização de carboidratos como uma resposta a perturbações das comunidades microbianas a incrementos relacionados a diferentes fontes de resíduos orgânicos ou um decréscimo relacionado ao estresse por metais (BOSSIO; SCOW, 1995).

### **6.3.3 PCA Ácidos Carboxílicos**

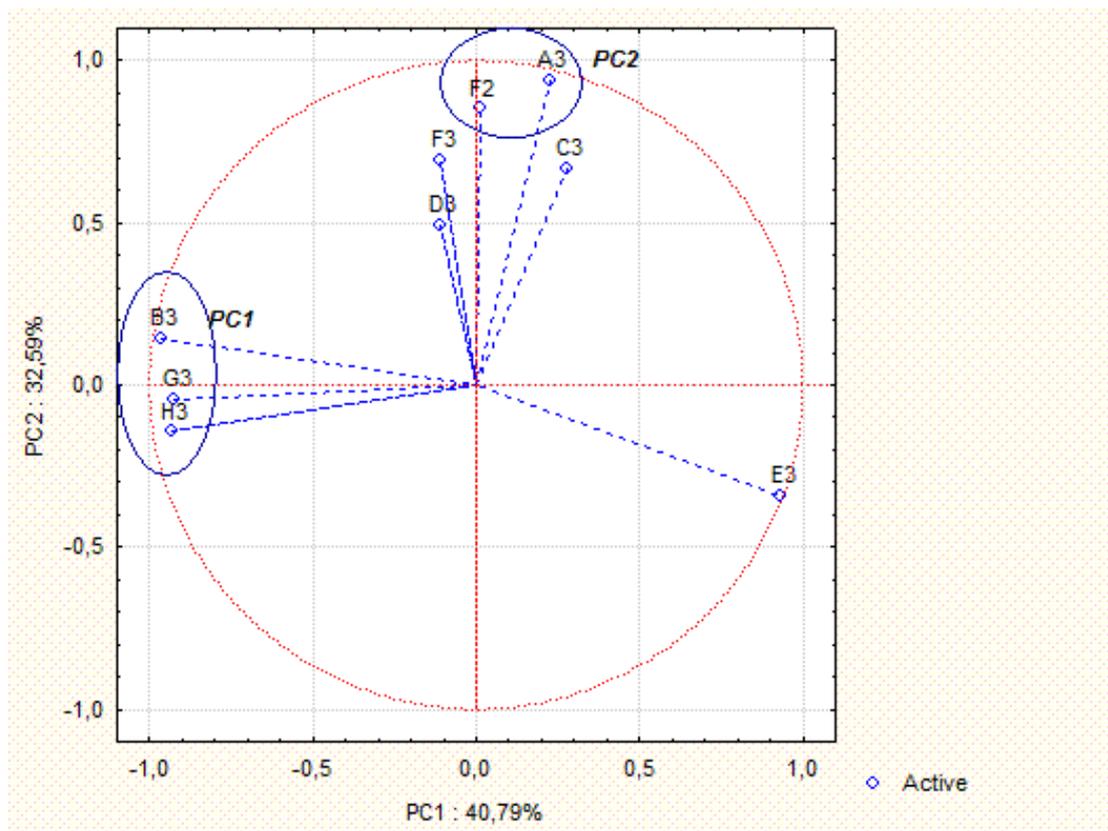
A análise de utilização dos ácidos carboxílicos pelas comunidades microbianas nos diferentes tipos de manejo dos solos, apresentou 3 componentes principais (Fig.15), com PC1 explicando 40,79%, PC2 explicando 32,59% e PC3 explicando 20,57% da variação na utilização das fontes de carbono desse grupo. A variação cumulativa dos 3 componentes foi de 93,96%.

As amostras de solo NAT-J, CONV-J e ORG-J são explicadas pelo componente principal 1 (PC1), ou seja, elas explicam 40,79% da variância dos dados. É possível observar que as amostras NAT-J, CONV-J e ORG-J se agruparam e foram diferentes das amostras de solo NAT-G e CONV-G. A amostra NAT-J também é explicada pelo PC2 (32,59%), a qual foi diferente das demais amostras de solo. De acordo com a análise de componentes principais a amostra NAT-J, é explicada pelos componentes principais (PC1 e PC2) totalizando 73,38% da variância total.



**Figura 15** - Ácidos Carboxílicos: gráfico da PCA com primeiro e segundo componente principal das amostras NAT-G (solo nativo da Usina Goiás), CONV-G (solo convencional da Usina Goiás), NAT-J (solo nativo da Usina Jalles), ORG-J (solo orgânico da Usina Jalles) e CONV-J (solo convencional da Usina Jalles) baseados nos valores de absorvância do Biolog EcoPlate.

A figura 16 ilustra as fontes de carbono que apresentaram maior metabolização, representadas pela PC1 e as fontes representadas pela PC2. Como pode ser observado as fontes B3- Ácido D-Galacturônico, G3- Ácido  $\alpha$ -Cetobutírico e H3- Ácido D-Málico (PC1) apresentaram maior índice de metabolização pela comunidade coletada do solo NAT-J, CONV-J e ORG-J e as fontes A3- Ácido D-Galactorônico  $\gamma$ -Lactona e F2- Ácido D-Glicosamínico (PC2) também apresentaram maior metabolização pela comunidade microbiana do solo nativo obtido na Usina Jalles Machado.

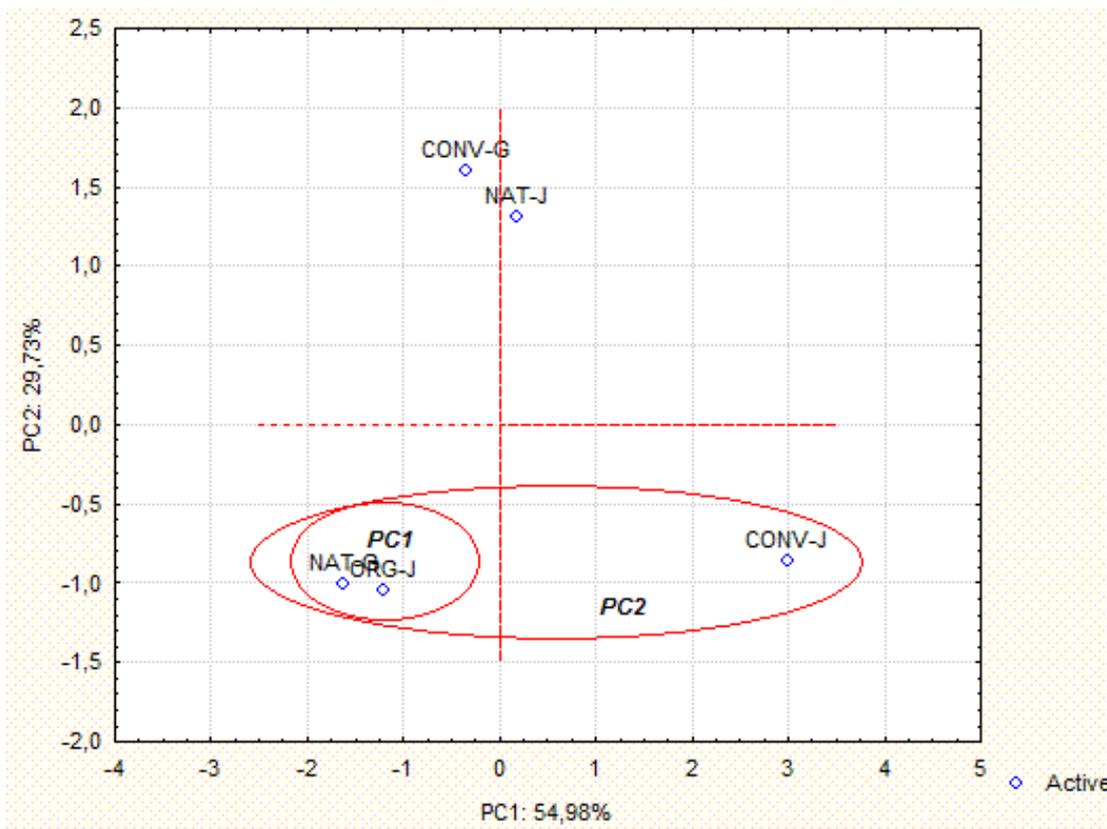


**Figura 16** – Ácidos Carboxílicos: PCA dos dois primeiros componentes principais para as fontes, A3- Ácido D-Galactorônico  $\gamma$ -Lactona, B3- Ácido D-Galacturônico, C3- Ácido 2-hidroxibenzóico, D3- Ácido 4-hidroxibenzóico, E3- Ácido  $\gamma$ -Hidroxibutírico, F2- Ácido D-Glicosamínico, F3- Ácido Itacônico, G3- Ácido  $\alpha$ -Cetobutírico e H3- Ácido D-Málico, com base nos valores de absorvância do Biolog EcoPlate.

Na avaliação da utilização de fontes de carbono em 5 amostras de solo sob diferentes vegetações (XUE-MEI et al., 2007), o solo sob relva artificial (PC1) se comportou diferente das outras amostras de solo avaliadas que foram: campo de soja, campo de milho, solo sob arbusto artificial e arbusto natural. Em seu trabalho a fonte de carbono D3 (Ácido 4-hidroxibenzóico) apresentou uma alta taxa de metabolização para a amostra de solo sob relva artificial.

### 6.3.4 PCA Aminoácidos

A análise de utilização de aminoácidos pelas comunidades microbianas dos solos resultou em dois componentes principais (PC1 e PC2) (Fig. 17).

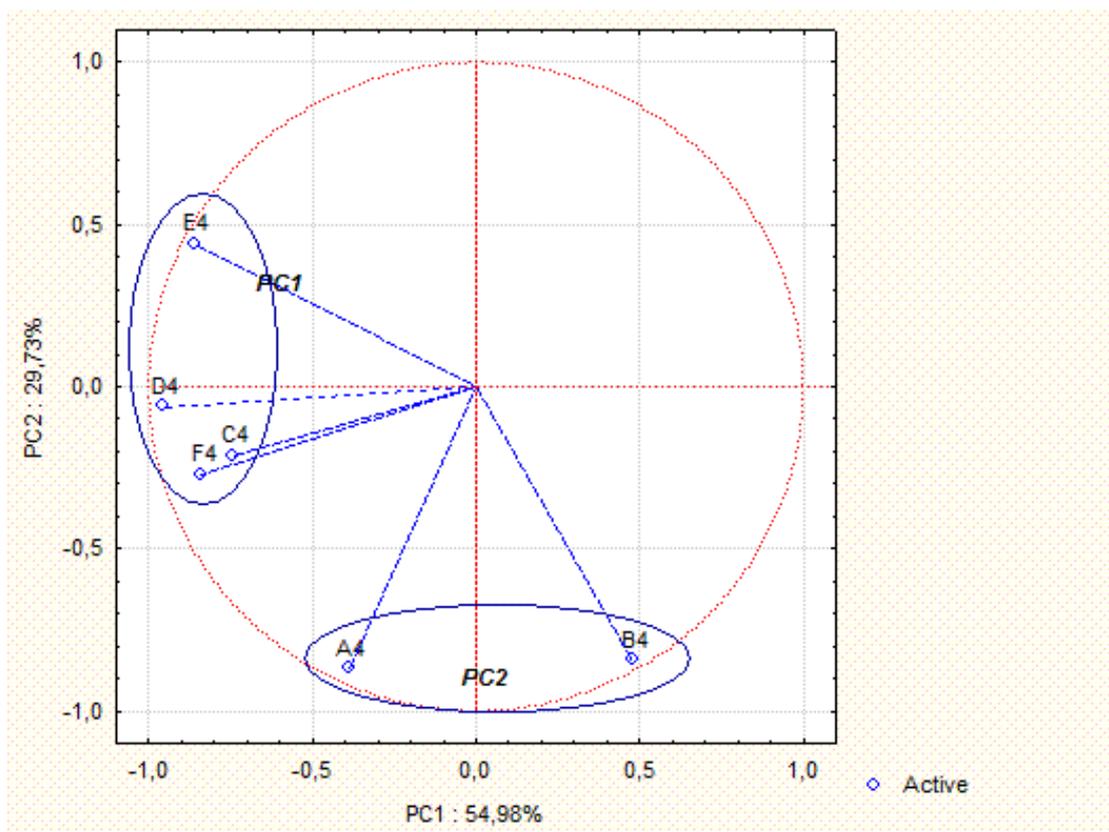


**Figura 17** - Aminoácidos: gráfico da PCA com primeiro e segundo componente principal das amostras NAT-G (solo nativo da Usina Goiás), CONV-G (solo convencional da Usina Goiás), NAT-J (solo nativo da Usina Jalles), ORG-J (solo orgânico da Usina Jalles) e CONV-J (solo convencional da Usina Jalles) baseados nos valores de absorvância do Biolog EcoPlate.

Como pode ser observada na figura 17 a comunidade microbiana presente nas amostras de solos sob manejo convencional e orgânico, bem como no solo controle (nativo) coletado na Usina Jalles Machado e na Usina Goiás, foram responsáveis por 54,98% da variância no Componente Principal 1 (PC1) e 29,73% da variância no PC2, totalizando 84,71% da variância total (PC1 e PC2).

A Figura 18 evidencia as fontes de carbono que apresentaram maior metabolização, frente aos componentes principais PC1 e PC2. Como pode ser observado as fontes C4- L-Fenilalanina, D4- L-Serina, E4-L-Treonina, F4- Ácido Glicil-L-Glutâmico (PC1) apresentaram maior índice de metabolização pela comunidade dos solos nativo obtidos nas amostras coletadas na Usina Goiás e amostras sob cultivo orgânico obtida na Usina Jalles e as fontes A4- L-Arginina, B4- L-Asparagina (PC2) apresentaram maior metabolização nas amostras de solo nativo

obtido na Usina Goiasa, bem como nas amostras de solo sob cultivo orgânico e convencional coletados na Usina Jalles Machado.



**Figura 18** - Aminoácidos: PCA dos dois primeiros componentes principais para as fontes A4- L-Arginina, B4- L-Asparagina, C4- L-Fenilalanina, D4- L-Serina, E4-L-Treonina, F4- Ácido Glicil-L-Glutâmico, com base nos valores de absorvância do Biolog EcoPlate.

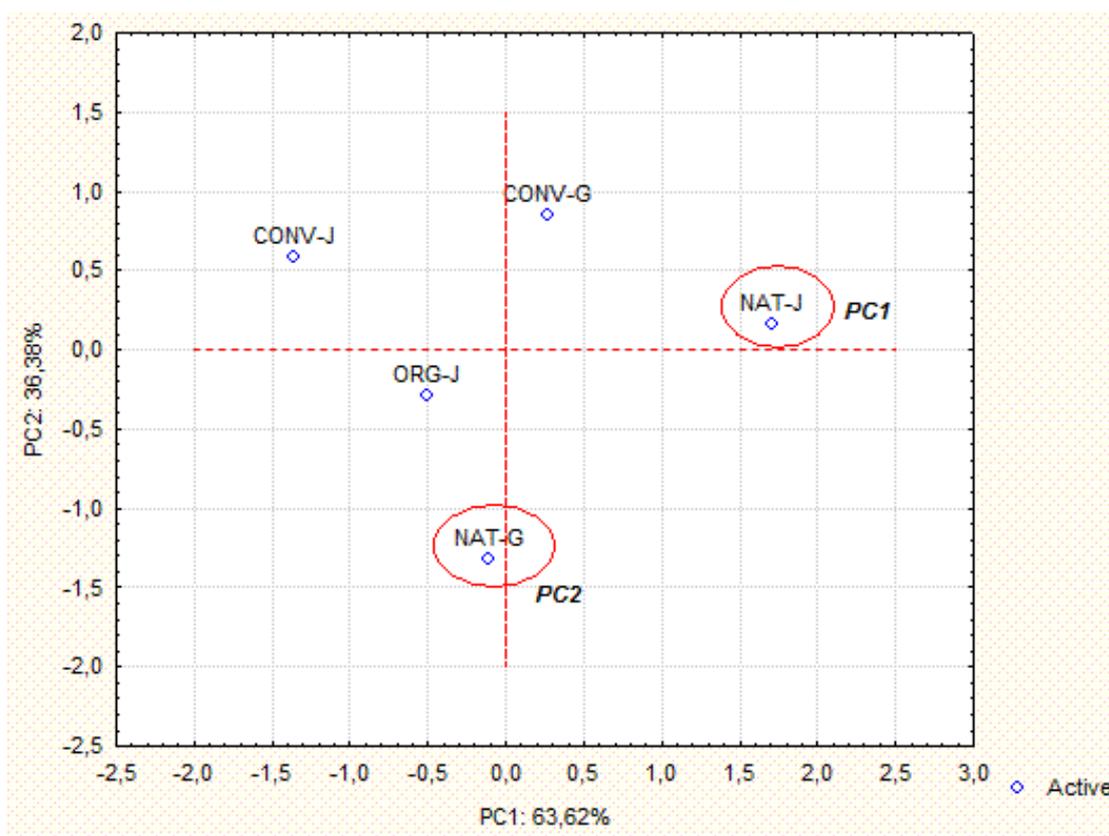
Como pode ser observado na metabolização dos aminoácidos as comunidades dos solos nativo da Usina Goiasa, orgânico e convencional da Usina Jalles apresentaram uma maior capacidade de utilização das fontes de carbono, no entanto as comunidades dos solos NAT-G e ORG-J apresentaram a capacidade de metabolizar um número maior de fontes (PC1 e PC2) do que a comunidade coletada do solo CONV-J (PC2).

Segundo Brackin et al., (2013) os solos que são submetidos a agricultura favorece a proliferação de grupos microbianos que utilizam as fontes de carbono prontamente disponíveis como os carboidratos e aminoácidos, em seu estudo esses grupos foram mais facilmente metabolizados pelos microrganismos, em solo agrícola

e as fontes de C que apresentaram maior metabolização foram arginina, asparagina e glutamato.

### 6.3.5 PCA Amina/Amida

A análise da utilização das amina/amidas como fonte de carbono pelas comunidades coletadas dos solos resultou em um PC1 explicando 63,62% da variação e um PC2 explicando 36,38% da variação na utilização das fontes. A variação total foi de 100% (Fig.19).

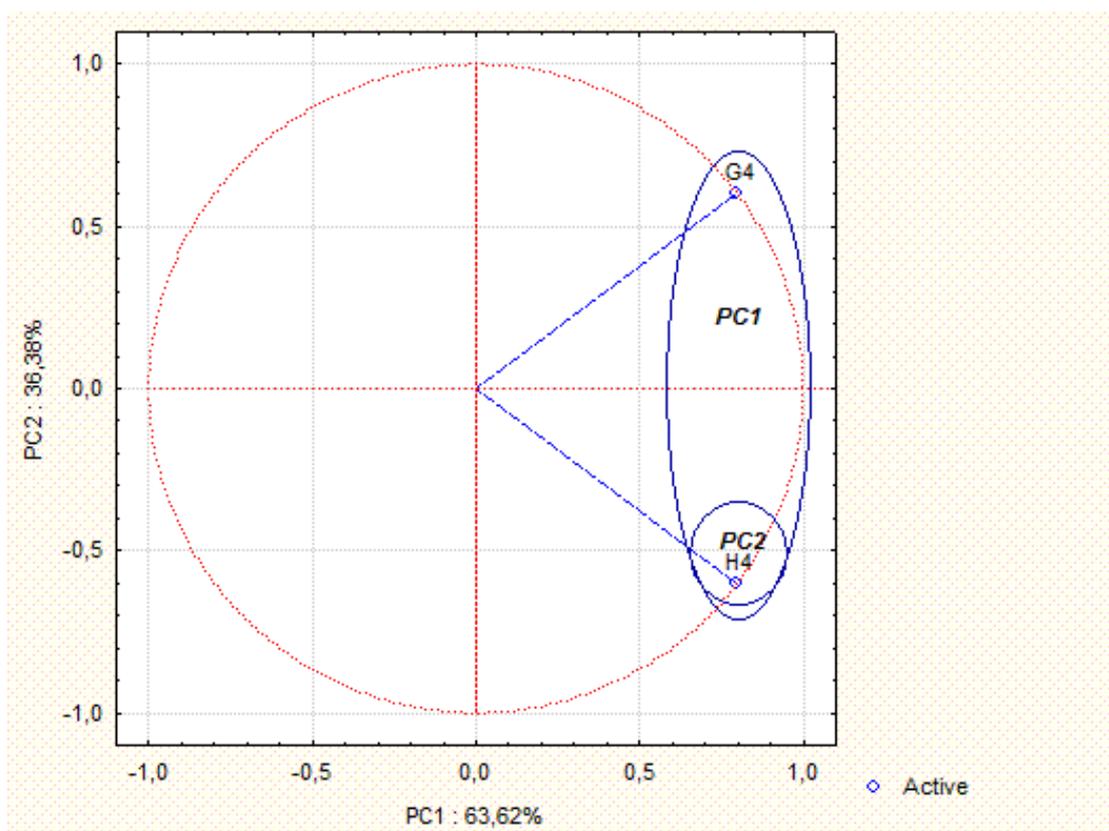


**Figura 19** - Amina/Amida: gráfico da PCA com primeiro e segundo componente principal das amostras NAT-G (solo nativo da Usina Goiasa), CONV-G (solo convencional da Usina Goiasa), NAT-J (solo nativo da Usina Jalles), ORG-J (solo orgânico da Usina Jalles) e CONV-J (solo convencional da Usina Jalles) baseados nos valores de absorvância do Biolog EcoPlate.

A amostra do solo NAT-J é explicada pelo componente principal 1 (PC1), ou seja, ela explica 63,62% da variância dos dados. É possível observar que a amostra

NAT-J difere das demais amostras de solo NAT-G, CONV-G, ORG-J e CONV-J. A amostra NAT-G é explicada pelo PC2 (36,38%), a qual foi diferente das demais amostras de solo.

A Figura 20 mostram as fontes de carbono que apresentaram maior metabolização, representadas pela PC1 e a fonte representada pela PC2. As fontes G4-Feniletilamina e H4-Putrescina (PC1) apresentaram maior índice de metabolização pela comunidade coletada do solo nativo da Usina Jalles e a fonte H4-Putrescina (PC2) também apresentou uma alta metabolização pela comunidade coletada do solo nativo da Usina Goiasa.



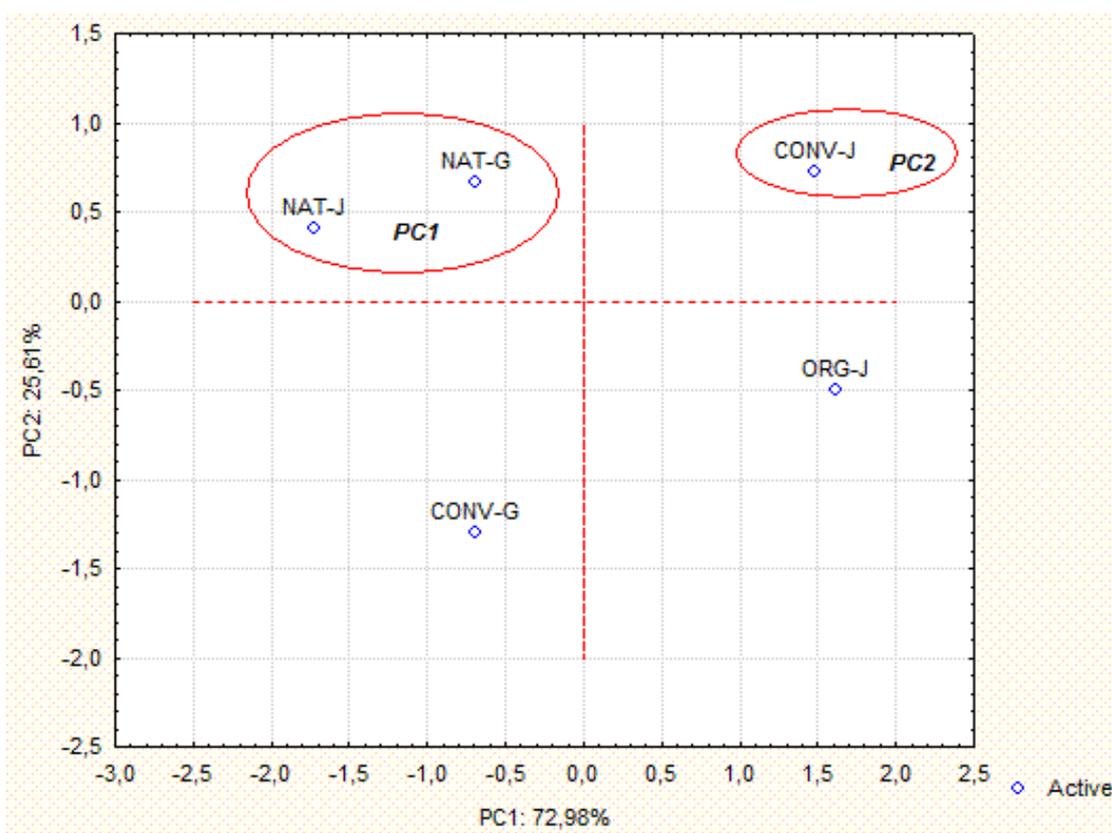
**Figura 20** – Amina/Amida: PCA dos dois primeiros componentes principais para as fontes G4-Feniletilamina e H4-Putrescina, com base nos valores de absorvância do Biolog EcoPlate.

Como pode ser observado na metabolização do grupo amina/amida a comunidade coletada do solo nativo da Usina Jalles Machado apresentou uma maior capacidade de utilização das duas fontes de carbono, e a comunidade coletada do solo nativo da Usina Goiasa apresentou uma alta metabolização apenas da fonte H4-Putrescina (PC2).

Xue-mei et al., (2007) em seu trabalho de avaliação do perfil de utilização de fontes de carbono pela comunidade microbiana de 5 amostras de solo, sendo elas proveniente de campo de soja, campo de milho, solo sob relva artificial, solo sob arbusto artificial e arbusto natural, relatou que a amostra de relva artificial se comportou diferente das demais.

### 6.5.6 PCA Miscelâneas

A análise das absorvâncias normalizadas das miscelâneas resultou em dois componentes principais (PC1 e PC2) (Fig. 21).



**Figura 21** - Miscelâneas: gráfico da PCA com primeiro e segundo componente principal das amostras NAT-G (solo nativo da Usina Goiasa), CONV-G (solo convencional da Usina Goiasa), NAT-J (solo nativo da Usina Jalles), ORG-J (solo orgânico da Usina Jalles) e CONV-J (solo convencional da Usina Jalles) baseados nos valores de absorvância do Biolog EcoPlate.

Como pode ser observado na figura 21 o primeiro componente principal (PC1) explica 72,98% da variação nos perfis de utilização das fontes de Carbono e o PC2 explica 25,61% dos dados obtidos, os dois componentes principais contribuíram com 98,58% da variação total.

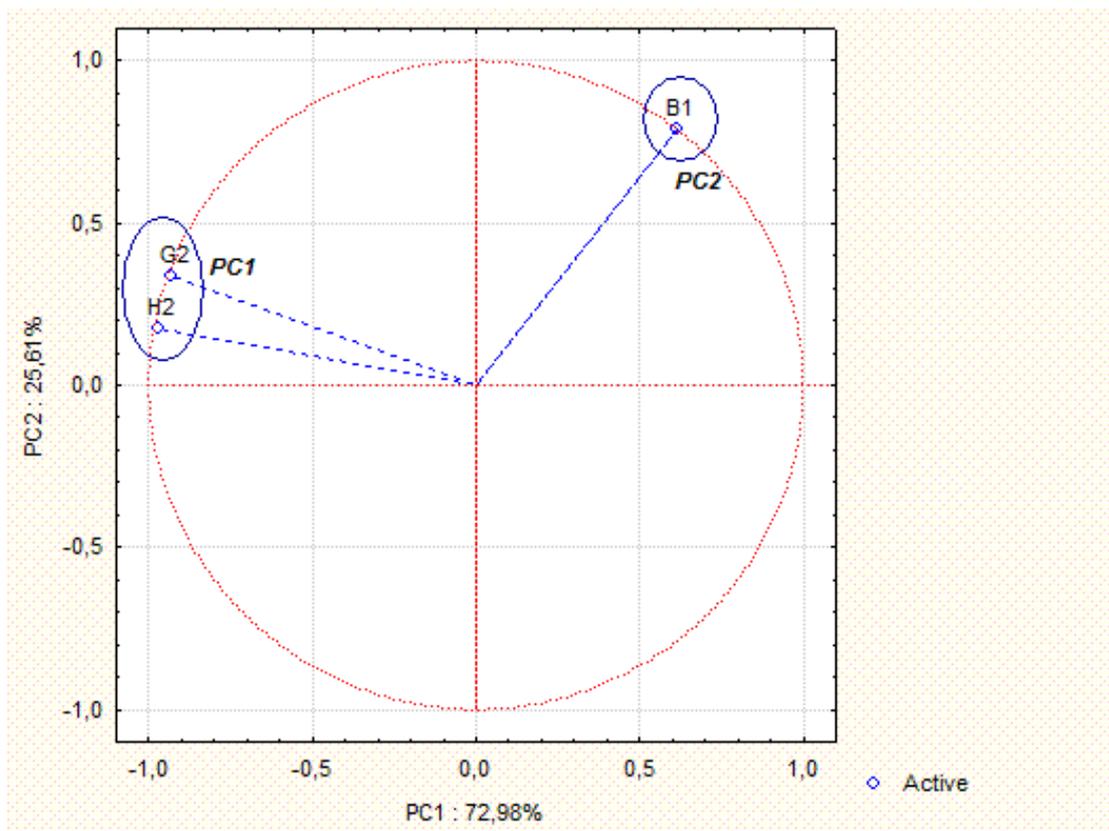
As comunidades microbianas existentes nas amostras de solo nativo (NAT-J) obtido na Usina Jalles Machado e na amostra NAT-G da usina Goiasa apresentaram uma maior capacidade de metabolização do grupo das miscelâneas representada pela PC1 e a comunidade existente nas amostras obtidas no solo sob cultivo convencional da Usina Jalles (CONV-J) apresentou a maior capacidade de metabolização para o segundo componente principal (PC2).

A Figura 22 mostram as fontes de carbono que apresentaram maior metabolização, representadas pela PC1 e a fonte representada pela PC2. As fontes G2-Glicose-1-fosfato e H2-D,L- $\alpha$ -Glicerol Fosfato (PC1) apresentaram maior índice de metabolização pela comunidade presente nas amostras de solos nativos coletadas nas duas Usinas e a fonte B1- Éster metílico do ácido pirúvico (PC2) apresentou uma alta metabolização pela comunidade microbiana presente nas amostras de solo sob cultivo convencional coletado na Usina Jalles Machado.

Huang et al., (2012), mostrou que o grupo das miscelâneas foram significativamente correlacionados com os componentes principais nas amostras de solo estudadas por ele, juntamente com polímeros, carboidratos e aminoácidos. Em nosso trabalho o grupo de miscelâneas apresentou uma forte correlação com os solos nativos obtidos nas duas usinas, bem como na amostra de solo sob cultivo convencional coletado na Usina Jalles Machado.

O PCA em si não fornece nenhuma informação específica sobre quais parâmetros ambientais estão controlando o agrupamento, mas os grupos podem estar relacionados ao uso de terras agrícolas, onde podem ser observados que para os grupos testados a comunidade microbiana do solo nativo da Usina Jalles Machado foi determinada como PC1 em 5 dos 6 grupos testados: polímeros (PC1-49,68%), carboidratos (PC1-47,95%), ácidos carboxílicos (PC1-40,79%), amina/amida (PC1-63,62%) e miscelâneas (PC1-72,98%) exceto para o grupo dos aminoácidos e a comunidade do solo nativo da Usina Goiasa foi determinado como PC1 em 3 dos 6 grupos testados: polímeros (PC1-49,68%), aminoácidos (PC1-

54,98%) e miscelâneas (PC1-72,98%). A comunidade do solo orgânico da Usina Jalles Machado foi determinada como PC1 apenas para ácidos carboxílicos (PC1-40,79%) e aminoácidos (PC1-54,98%) e a comunidade do solo convencional da Usina Jalles foi determinada como PC1 apenas para o grupo dos ácidos carboxílicos (PC1-40,79%).



**Figura 22** - Miscelâneas: PCA dos dois primeiros componentes principais para as fontes B1- Éster metílico do ácido pirúvico, G2- Glicose-1-fosfato e H2- D,L- $\alpha$ -Glicerol Fosfato, com base nos valores de absorvância do Biolog EcoPlate.

Já a comunidade microbiana do solo nativo da Usina Goiasa foi determinada como PC2 em 4 dos 6 grupos testados: polímeros (PC2-32,80%), carboidratos (PC2-33,54%), aminoácidos (PC2-29,73%) e amina/amida (PC2-36,38%). A comunidade do solo nativo da Usina Jalles Machado foi determinada no PC2 apenas para o grupo dos ácidos carboxílicos (PC2-32,59%), a comunidade do solo orgânico da Usina Jalles foi determinada como PC2 para os polímeros (PC2-32,80%) e aminoácidos (29,73%) e a comunidade do solo de manejo convencional da Usina Jalles foi determinada como PC2 para os grupos aminoácidos (PC2-29,73%) e miscelâneas (PC2-25,61%).

A diversidade metabólica encontrada nas diferentes amostras estudadas vão de encontro às características físicas e biológicas do solo, descritas por vários autores.

Segundo Degens et al., (2000) os declínios no perfil de metabolização têm sido mais pronunciados em solos submetidos a manejos agrícolas quando comparado a solos nativos. Xue-mei et al., (2007) amplia a discussão do tema em seus trabalhos, e relata que o elevado número de espécies de plantas (solos nativos) pode produzir uma grande diversidade de resíduos e conseqüentemente, provocar a formação de uma comunidade microbiana mais rica com maior capacidade de utilização de substratos diferenciados.

No entanto, para Brackin et al., (2013), a biomassa microbiana reduzida é uma característica intrínseca do manejo, quando comparado com correspondentes solos com vegetação natural. A diminuição na maioria das atividades enzimáticas e as mudanças na composição das populações microbianas são também comuns, fatores estes que podem ser seguidos de quedas acentuadas na biomassa fúngica e aumentos na diversidade bacteriana.

Pengthamkeerati; Montavalli; Kremer (2011) relatam que os micro-organismos são componentes importantes para a fertilidade do solo, bem como, para a produtividade e sustentabilidade dos agroecossistemas. A alteração dos agroecossistemas devido à compactação induzida por mudanças nas propriedades físicas do solo (compactação pela utilização de máquinas agrícolas) pode ter um impacto significativo na produção agrícola e recursos ambientais. As mudanças na distribuição do tamanho dos poros do solo devido à compactação severa podem alterar os micro-habitats de microrganismos do solo, que altera a distribuição e a atividade microbiana, modifica a estrutura da comunidade microbiana e afeta os processos e funções do solo.

Nesse estudo a comunidade presente no solo nativo do cerrado goiano apresentou uma maior capacidade de metabolização de fontes de C, utilizando Biolog EcoPlate para avaliação do perfil metabólico. Xue-mei et al., (2007) descreve que em solos menos perturbados, diferentes populações microbianas interagem umas com as outras e ao longo do tempo elas podem ser combinadas formando uma comunidade compatível, que pode utilizar um maior número de substratos. No

entanto, em solos perturbados, o equilíbrio é quebrado, o que irá conduzir a uma menor utilização dos substratos.

#### *6.4 CINÉTICA DE CRESCIMENTO DA COMUNIDADE MICROBIANA DO SOLO NATIVO DA USINA GOIASA.*

##### **6.4.1 Seleção dos meios de cultura com melhor taxa de crescimento**

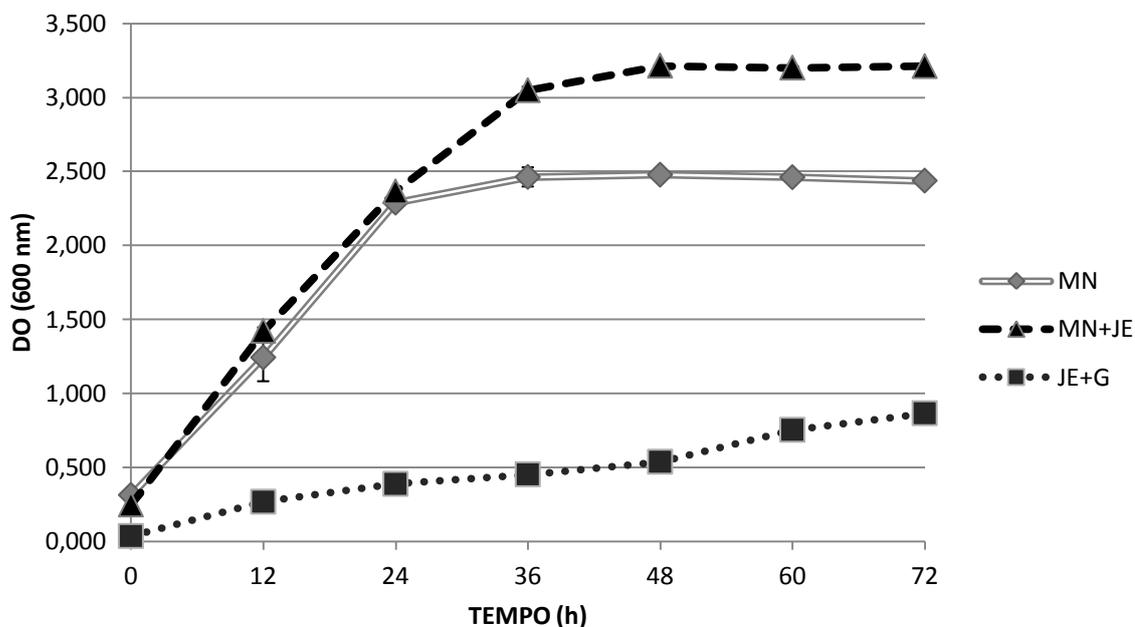
Os micro-organismos apresentam basicamente as necessidades nutritivas que todos os seres vivos. No crescimento de micro-organismos alguns componentes são necessários, os elementos mais importantes são o carbono, o hidrogênio, o oxigênio, o nitrogênio, o enxofre e o fósforo (AQUARONE et al., 2008).

Não existe um meio de cultura universal, no entanto na elaboração de meios de cultura se faz necessário a disponibilização de fontes de carbono, as mais comuns utilizadas são os carboidratos, principalmente D-glicose, aminoácidos, ácidos monocarboxílicos, lipídeos, alcoóis e mesmo polímeros como amido e celulose podem ser utilizados. Alguns micro-organismos também necessitam de fontes orgânicas de nitrogênio, a adição de aminoácidos ou hidrolisados de proteínas favorece o crescimento da maioria dos micro-organismos heterotróficos (AQUARONE et al., 2008).

Íons inorgânicos essenciais também são necessários para o desenvolvimento dos micro-organismos, o fósforo por exemplo, sob a forma de fosfatos é importante no metabolismo energético e na síntese de ácidos nucléicos. O enxofre é constituinte de alguns aminoácidos e síntese de vitaminas. O magnésio que é ativador de enzimas extracelulares e um importante fator na esporulação. Em alguns casos cobre, cobalto, zinco, manganês, boro, ferro, níquel, sódio e outros íons são essenciais ao metabolismo e crescimento de microrganismos (AQUARONE et al., 2008; VALIX; LOON, 2003).

Na avaliação do crescimento da comunidade microbiana foram utilizados três meios de cultura, com objetivo de fornecer os elementos essenciais de crescimento para a comunidade microbiana do solo nativo da Usina Goiasa. Os meios utilizados

foram: Meio Nutriente (MN), Meio Nutriente +Jones e Edington (MN+JE) e Jones e Edington + Glicose (JE+G), para verificar em qual meio ocorreria melhor taxa de desenvolvimento da comunidade (Fig.23).

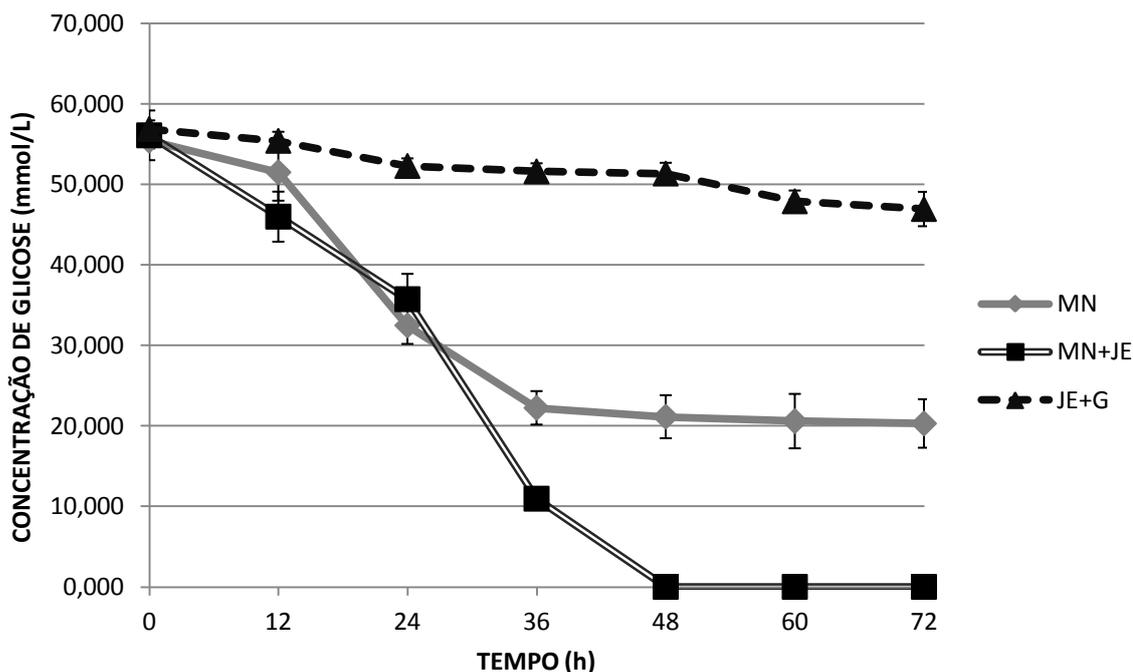


**Figura 23.** Cinética de crescimento da comunidade microbiana do solo nativo da Usina Goiasa em tres diferentes meio de cultura: MN, MN+JE e JE+G, no período de 72 horas.

Como pode ser observado na figura 23 a comunidade microbiana apresentou a melhor taxa de crescimento no meio de cultura MN+JE, isso pode ser explicado devido a presença de íons como o  $Mg^{2+}$  que atuam como co-fator de enzimas no processo de metabolização e de outros íons metálicos que têm influência direta sobre os processos fisiológicos e bioquímicos dos microrganismos, que também faziam parte da composição do meio como Zn, Mn, Ca, Fe, sulfato e fosfato (BAZAES et al., 2007). Também pode ser observado que o meio JE+G apresentou uma taxa de crescimento menor provavelmente pela ausência de aminoácidos, peptídeos, e nutrientes essenciais ao crescimento microbiano que estão ausentes na formulação deste meio de cultura.

Na Figura 24 observa-se o consumo de glicose em relação ao crescimento celular apresentado na figura 23. O consumo de glicose foi maior no meio de cultura MN+JE, onde é possível perceber que toda glicose foi consumida no período de 48

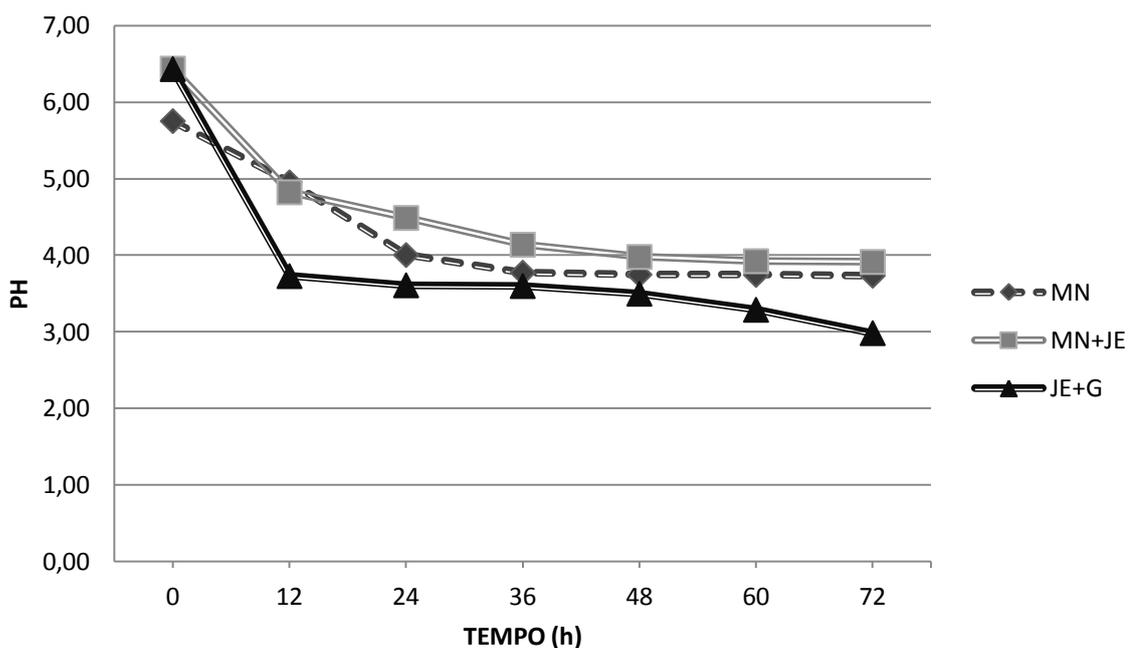
horas e quando inoculados em meio MN apresentou uma redução de 38%, enquanto que neste mesmo período o teor de glicose consumida no meio JE + G foi de apenas 8%. Como pode ser observado os micro-organismos do meio MN e JE+G, não foram capaz de utilizar a glicose com a mesma eficiência do meio MN+JE (Fig. 24).



**Figura 24.** Consumo de glicose durante o crescimento da comunidade microbiana do solo nativo da Usina Goiás em três diferentes meios de cultura: MN, MN+JE e JE+G, no período de 72 horas.

Esses dados mostram que a comunidade microbiana no meio MN+JE apresentou o maior consumo de glicose e também a maior taxa de crescimento entre os meios testados.

O pH do sistema foi avaliado durante toda a cinética de crescimento com o intuito de observar o comportamento da comunidade microbiana ao longo do processo. Pode-se observar uma diminuição do pH durante o crescimento dos micro-organismos em todos os meios de cultura utilizados (Fig. 25). Em meio MN + JE o pH inicial foi 5.8 e o final 3.8, para o meio MN o pH inicial foi 6.5 no entanto o ponto final para o pH foi 3.9 e para o meio JE+G o valor do pH final foi de 3.0.

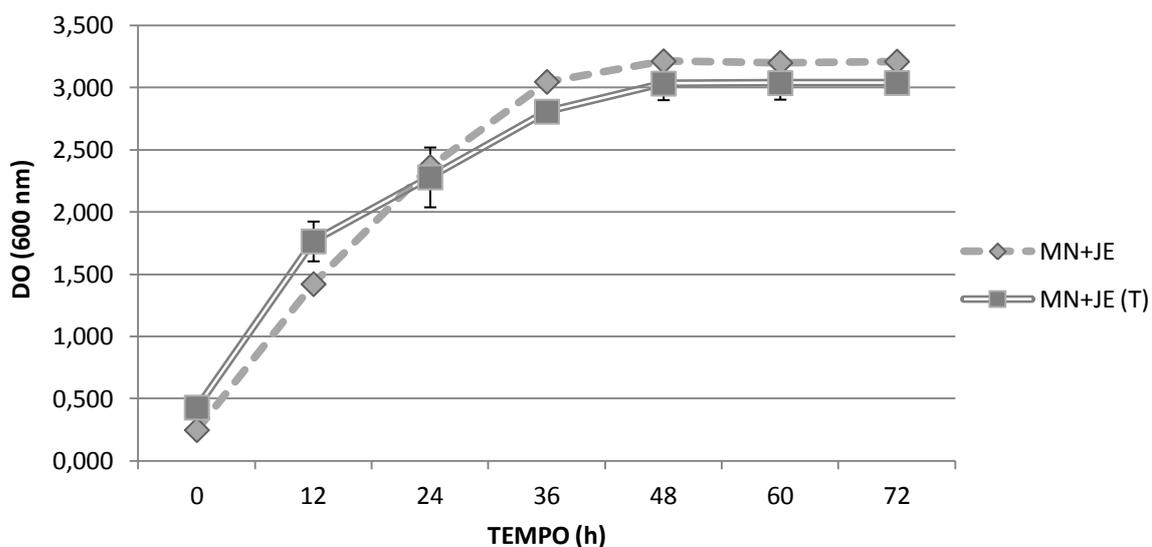


**Figura 25.** Avaliação do pH durante a cinética de crescimento da comunidade microbiana do solo nativo da Usina Goiasa em três diferentes meios de cultura: MN, MN+JE e JE+G, no período de 72 horas.

Fungos e bactérias presentes na natureza tem a capacidade de degradar glicose pela ação de enzimas e utilizá-la como fonte de carbono, ao final da reação de degradação da glicose por esses micro-organismos os produtos formados são  $\text{CO}_2$  e água. O  $\text{CO}_2$  produzido pela reação de degradação da glicose pode influenciar o pH levando a acidificação do meio de cultura (FRANCHETTI; MARCONATO, 2006).

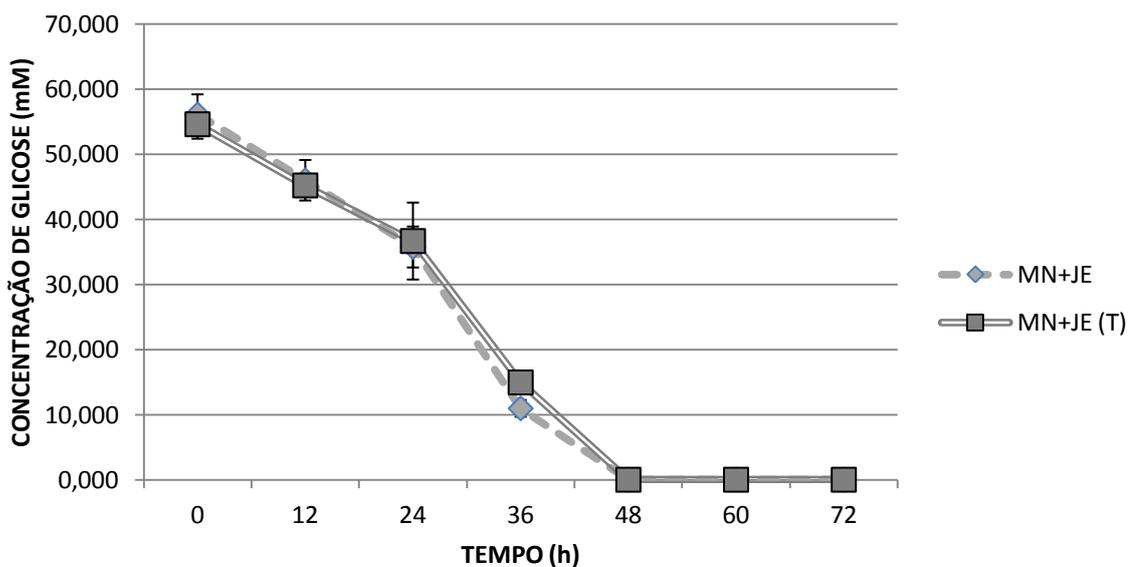
#### **6.4.2 Tamponamento do biorreator com tampão $\text{K}_2\text{HPO}_4$**

Com o intuito de diminuir a variação do pH, foi avaliado o crescimento da comunidade microbiana com controle do pH utilizando o fosfato de potássio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), com efeito tamponante do meio (Fig. 26).

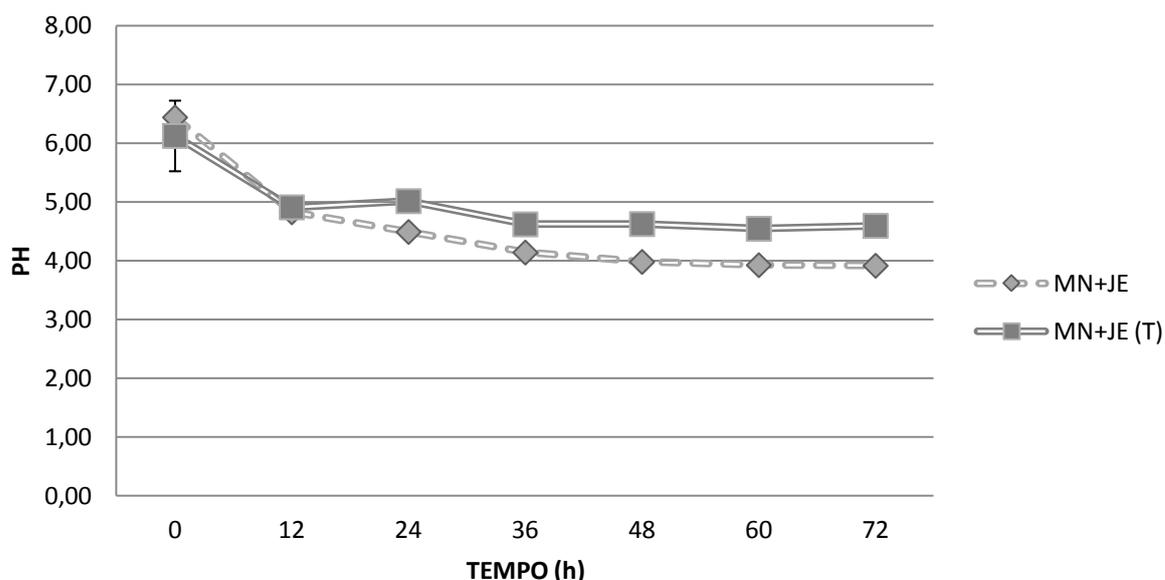


**Figura 26.** Cinética de crescimento da comunidade microbiana do solo nativo da Usina Goiasa nos meios de cultura MN+JE e MN+JE suplementado com tampão  $K_2HPO_4$  no período de 72 horas.

O biorreator foi suplementado com  $K_2HPO_4$  na concentração de  $0,05 \text{ mmol/L}^{-1}$  a cada 12 horas. Como pode ser observado nas figuras (26, 27 e 28) a suplementação do tampão não alterou significativamente a taxa de crescimento dos micro-organismos, bem como o consumo de glicose e pH do meio no período de 72 horas.



**Figura 27.** Consumo de glicose durante o crescimento da comunidade microbiana do solo nativo da Usina Goiasa nos meios de cultura MN+JE e MN+JE (T) suplementado com tampão  $K_2HPO_4$  no período de 72 horas.



**Figura 28.** Avaliação do pH da cinética de crescimento da comunidade microbiana do solo nativo da Usina Goiás nos meios de cultura MN+JE e MN+JE (T) suplementado com tampão  $K_2HPO_4$  no período de 72 horas.

A utilização do  $K_2HPO_4$  na concentração de 0,05 mmol/L a cada 12 horas, não foi suficiente para estabelecer efeito tamponante no biorreator. No entanto observamos uma variação de 0,7 no pH. Visto que o pH é um fator que influencia a atividade dos microrganismos presentes no solo e na estrutura das comunidades microbianas (MALUCHE-BARETTA, 2007), outros tampões foram utilizados para realização do tamponamento do biorreator.

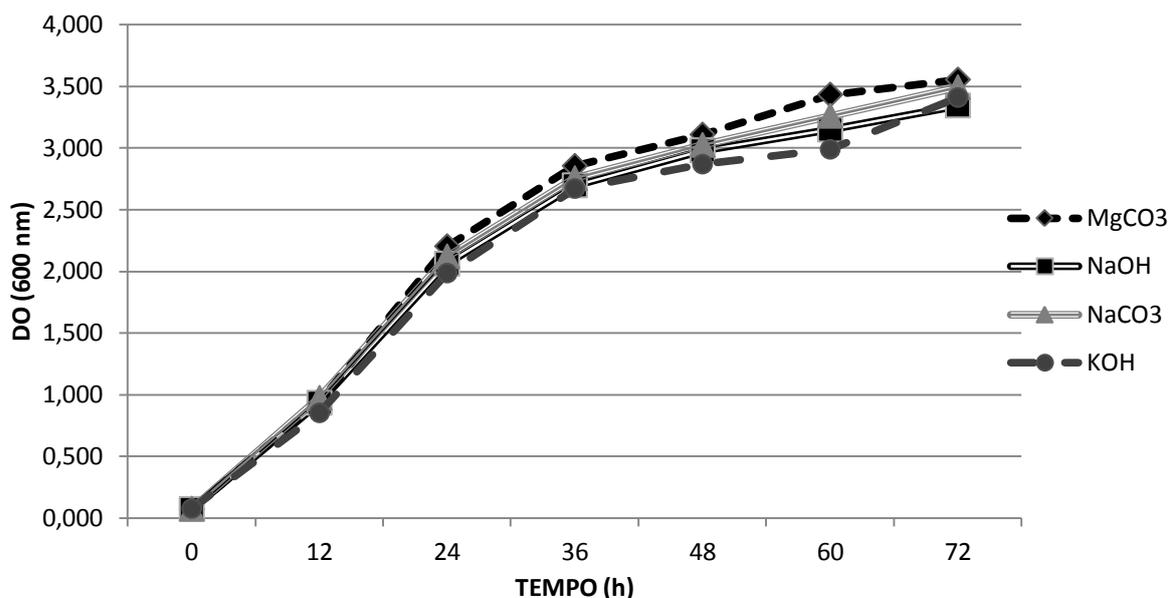
#### **6.4.3 Tamponamento do biorreator com os tampões $MgCO_3$ , $NaOH$ , $Na_2CO_3$ e $KOH$ .**

Li et al., (2010) investigaram a utilização de  $Ca(OH)_2$ ,  $NaOH$ ,  $Na_2CO_3$ ,  $NaHCO_3$ ,  $Mg(OH)_2$  e  $NH_3.H_2O$  como neutralizador alcalino. Os compostos  $MgCO_3$ ,  $Na_2CO_3$ ,  $NaHCO_3$  e  $NH_3.H_2O$  também foram utilizados em biorreatores como reguladores de pH.

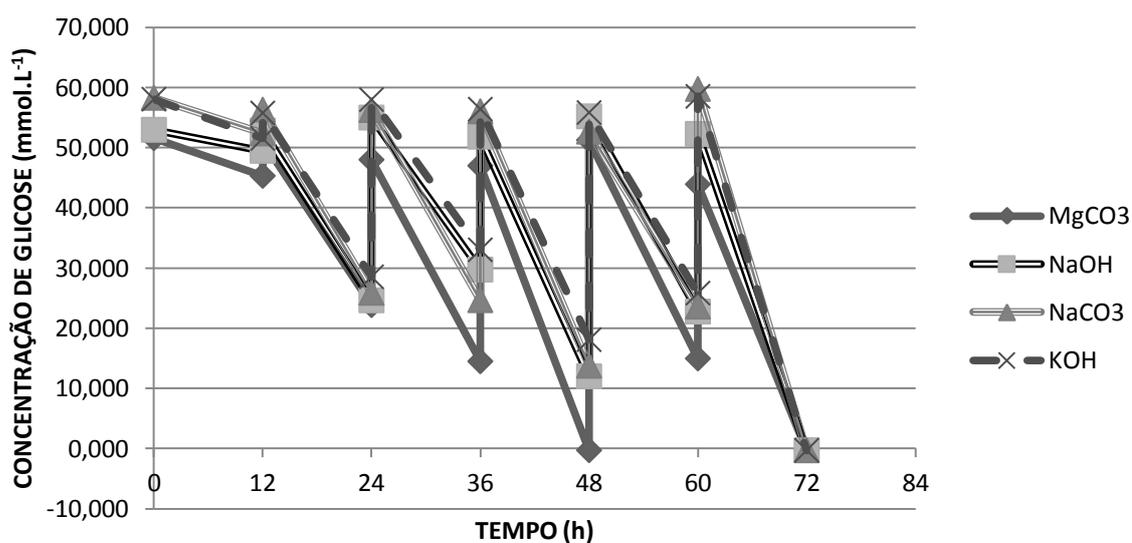
Para realizar o controle do pH nos biorreatores durante o crescimento, foram utilizadas soluções tampões de  $MgCO_3$ ,  $NaOH$ ,  $Na_2CO_3$  e  $KOH$  com suplementação a cada 12 horas para manter o pH próximo a faixa de 6 (pH do solo). A glicose do

reator também foi suplementada a cada 12 horas para fornecer fonte de carbono para a comunidade microbiana e produção de massa celular.

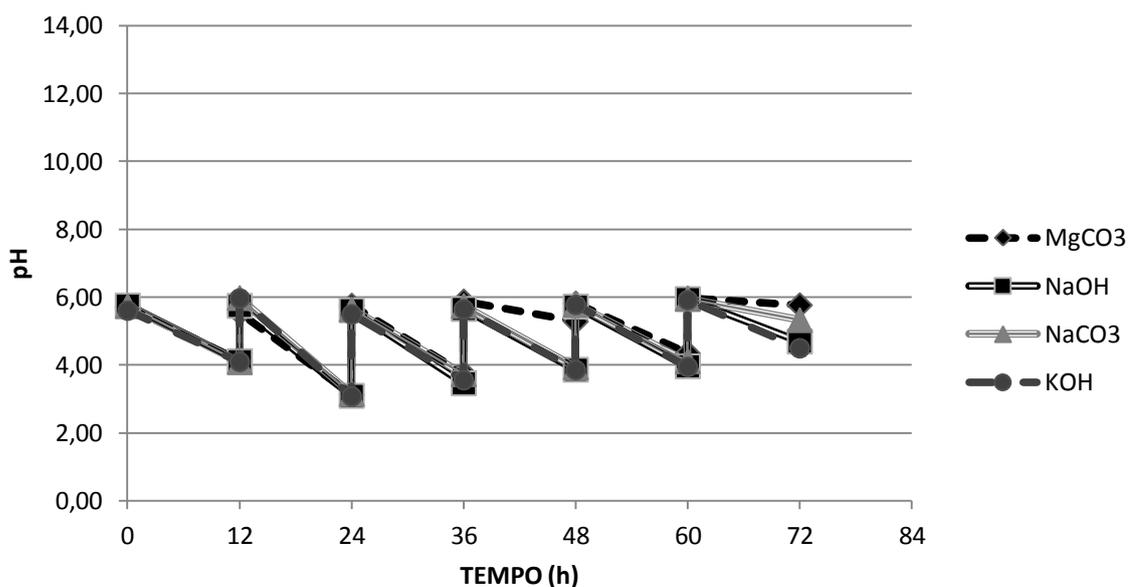
Com o intuito de verificar o efeito de tais compostos na viabilidade celular foi avaliado a cinética de crescimento microbiano (Fig. 29), o consumo de glicose (Fig.30) e o pH (Fig. 31).



**Figura 29.** Cinética de crescimento da comunidade microbiana do solo nativo da Usina Goiasa utilizando meio de cultura MN+JE suplementado com tampão MgCO<sub>3</sub>, NaOH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e KOH no intervalo de 12 em 12 horas no período de 72 horas.



**Figura 30.** Consumo de glicose durante o crescimento da comunidade microbiana do solo nativo da Usina Goiasa utilizando meio de cultura MN+JE suplementado com tampão MgCO<sub>3</sub>, NaOH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e KOH no intervalo de 12 em 12 horas no período de 72 horas.



**Figura 31.** Avaliação do pH da cinética de crescimento da comunidade microbiana do solo nativo da Usina Goiás, utilizando meio de cultura MN+JE suplementado com tampão MgCO<sub>3</sub>, NaOH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e KOH até atingir uma faixa próxima de 6,0 no intervalo de 12 em 12 horas no período de 72 horas.

Na avaliação do tamponamento do biorreator foram adicionados os tampões MgCO<sub>3</sub>, NaOH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e KOH até que o pH atingisse uma faixa próximo a 6,0. A suplementação dos tampões foi realizada a cada 12 horas em um período de 72 horas.

Como pode ser observado na (Figura 29) não houve diferença na taxa de crescimento dos microrganismos no biorreator utilizando as soluções tampões MgCO<sub>3</sub>, NaOH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e KOH na correção do pH do meio.

O consumo de glicose no biorreator suplementado com MgCO<sub>3</sub> apresentou maior taxa de consumo em 36, 48, 60 e 72 horas (Fig. 30). O aumento do consumo pode ser explicado pelo Mg<sup>2+</sup> funcionar como co-fator de enzimas envolvidas na degradação da glicose e como íon essencial ao crescimento de alguns microrganismos (BAZAES et al., 2007), outros íons também podem ter influenciado no consumo de glicose, visto que no teste se trata de uma comunidade microbiana e podem haver várias rotas de metabolização pelos microrganismos.

No controle do pH utilizando as soluções tampão, os biorreatores apresentaram diminuição do pH após a suplementação, mostrando que o

tamponamento do biorreator não ocorreu de forma eficiente (Fig. 31). No entanto para o biorreator suplementado com  $MgCO_3$  nos pontos de 48h e 72h apresentaram uma faixa de pH mais alta (alcalino), sendo os valores de pH 5,29 em 48 horas e pH 5,77 em 72 horas, a glicose também nos pontos de 48h e 72h desse biorreator foi totalmente consumida. Esse aumento do pH pode ser explicado pelo fato que na ausência de glicose, os micro-organismos possam ter utilizado peptídeos para produção de energia, em consequência pode ter ocorrido liberação de amônia e alcalinização do meio. Segundo Yang e Silva (1995) um dos processos que pode causar mudanças no pH do meio é a desaminação de aminoácidos.

O composto  $Ca(OH)_2$  também tem sido utilizado como neutralizantes em fermentadores. No entanto o  $Ca^{2+}$  é tóxico para alguns micro-organismos, ele também pode alterar a fluidez normal e permeabilidade das membranas celulares, o que pode afetar o crescimento celular e o metabolismo (SONG et al., 2007; LI et al., 2010). O composto  $Na^+$  no metabolismo celular desempenha um papel importante na manutenção do gradiente de pH transmembranar, na pressão osmótica das células e na regulação do pH intracelular (LIU et al., 2008). Altos níveis de  $Na^+$  resulta em um ambiente hipertônico que causa um efeito negativo no crescimento celular e consequentemente no metabolismo (LEE et al., 1999). Desta forma, dentre os compostos utilizados o  $MgCO_3$  está entre os componentes que agem como reguladores do pH e contribuem positivamente para o crescimento celular.

#### *6.5 DETERMINAÇÃO DO PERFIL METABÓLICO DA COMUNIDADE MICROBIANA DOS BIORRETORES COM MEIO MN+JE E MEIO MN+JE+ $MgCO_3$ – UTILIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS POR GRUPOS (BIOLOG ECOPLATE)*

Amostras dos biorreatores com meio MN+JE e meio MN+JE+ $MgCO_3$  com 36 horas crescimento foram coletadas e as suspensões microbianas obtidas foram inoculadas nas placas de Biolog EcoPlate e incubadas a  $\pm 25^\circ C$  no período de 120 horas, após o período de incubação a comunidade microbiana do biorreator com meio MN+JE foi capaz de metabolizar 12 fontes de carbono e a comunidade microbiana do biorreator com meio MN+JE+ $MgCO_3$  foi capaz de metabolizar 27 das 31 fontes testadas.

A tabela 3 mostra a capacidade de metabolização das fontes de carbono dividida por grupos para as amostras das comunidades microbianas dos biorreatores.

**Tabela 3** – Capacidade de metabolização da comunidade microbiana dos biorreatores com meio MN+JE e meio MN+JE+MgCO<sub>3</sub> com 36 horas de crescimento em biorreator e 120 horas de incubação em placas Biolog EcoPlate, dados representados por grupos.

POLIMEROS	MN+JE	MN+JE+ MgCO <sub>3</sub>
C1	(0,217) <sup>a</sup>	(0,107) <sup>a</sup>
D1	(0,000) <sup>b</sup>	(0,434) <sup>a</sup>
E1	(0,000) <sup>b</sup>	(0,164) <sup>a</sup>
F1	(0,000) <sup>b</sup>	(0,293) <sup>a</sup>
CARBOIDRATOS	MN+JE	MN+JE+ MgCO <sub>3</sub>
A2	(0,007) <sup>b</sup>	(0,242) <sup>a</sup>
B2	(0,033) <sup>b</sup>	(1,255) <sup>a</sup>
C2	(0,000) <sup>a</sup>	(0,034) <sup>a</sup>
D2	(0,000) <sup>b</sup>	(0,236) <sup>a</sup>
E2	(0,009) <sup>a</sup>	(0,049) <sup>a</sup>
G1	(0,000) <sup>b</sup>	(0,251) <sup>a</sup>
H1	(0,000) <sup>b</sup>	(0,213) <sup>a</sup>
AC. CARBOXÍLICOS	MN+JE	MN+JE+ MgCO <sub>3</sub>
A3	(0,013) <sup>b</sup>	(0,052) <sup>a</sup>
B3	(0,004) <sup>b</sup>	(0,299) <sup>a</sup>
C3	(0,000) <sup>a</sup>	(0,019) <sup>a</sup>
D3	(0,000) <sup>a</sup>	(0,002) <sup>a</sup>
E3	(0,140) <sup>a</sup>	(0,118) <sup>a</sup>
F2	(0,000) <sup>b</sup>	(0,038) <sup>a</sup>
F3	(0,000) <sup>b</sup>	(0,032) <sup>a</sup>
G3	(0,006) <sup>a</sup>	(0,066) <sup>a</sup>
H3	(0,000) <sup>b</sup>	(0,040) <sup>a</sup>
AMINOÁCIDOS	MN+JE	MN+JE+ MgCO <sub>3</sub>
A4	(0,009) <sup>b</sup>	(0,049) <sup>a</sup>
B4	(0,003) <sup>b</sup>	(0,020) <sup>a</sup>
C4	(0,000) <sup>b</sup>	(0,048) <sup>a</sup>
D4	(0,000) <sup>b</sup>	(0,054) <sup>a</sup>
E4	(0,000) <sup>a</sup>	(0,037) <sup>a</sup>
F4	(0,000) <sup>b</sup>	(0,050) <sup>a</sup>
AMINA/AMIDA	MN+JE	MN+JE+ MgCO <sub>3</sub>
G4	(0,020) <sup>b</sup>	(0,063) <sup>a</sup>
H4	(0,000) <sup>b</sup>	(0,059) <sup>a</sup>
MISCELÂNIAS	MN+JE	MN+JE+ MgCO <sub>3</sub>
B1	(0,046) <sup>a</sup>	(0,076) <sup>a</sup>
G2	(0,000) <sup>b</sup>	(0,047) <sup>a</sup>
H2	(0,000) <sup>b</sup>	(0,059) <sup>a</sup>

Como pode ser observado na tabela 3 para o grupo dos polímeros a fonte Tween 40 (C1) não apresentou diferença significativa na metabolização pela comunidade microbiana do biorreator com meio MN+JE e do meio MN+JE+MgCO<sub>3</sub> com 36 horas de crescimento após 120 horas de incubação das placas Biolog EcoPlate. No entanto as fontes Tween 80 (D1),  $\alpha$ -ciclodextrina (E1) e Glicogênio (F1) foram metabolizados apenas pela comunidade microbiana do biorreator com meio MN+JE+MgCO<sub>3</sub> e a comunidade microbiana do biorreator com crescimento em meio MN+JE não foi capaz de metabolizar essas fontes.

Na avaliação da metabolização dos carboidratos nos biorreatores, duas das sete fontes testadas, não apresentaram diferenças significativas entre os biorreatores, sendo elas a C2 e E2. As fontes  $\beta$ -Metil-D-Glicosídeo (A2), D-Xilose (B2), D-Manitol (D2), D-celobiose (G1) e  $\alpha$ -D-Lactose (H1) foram significativamente diferentes entre os biorreatores.

Na avaliação da metabolização dos ácidos carboxílicos nas amostras dos biorreatores nove fontes de C foram testadas, sendo que para quatro delas não houve diferença estatística significativa, são elas: Ácido 2-hidroxibenzóico (C3), Ácido 4-hidroxibenzóico (D3), Ácido  $\gamma$ -Hidroxibutírico (E3) e Ácido  $\alpha$ -Cetobutírico (G3). No entanto as fontes Ácido D-Galactorônico  $\gamma$ -Lactona (A3), Ácido D-Galacturônico (B3), Ácido D-Glicosamínico (F2), Ácido Itacônico (F3) e Ácido D-Málico (H3) foram estatisticamente diferentes. Na metabolização dos aminoácidos apenas a fonte L-Treonina (E4) não apresentou diferença estatística dentre as seis fontes de C testadas, já as fontes L-Arginina (A4), L-Asparagin (B4), L-Fenilalanina (C4), L-Serina (D4) e Ácido Glicil-L-Glutâmico (F4) foram estatisticamente diferentes e apresentaram maiores índices de metabolização para a amostra do biorreator contendo o meio MN+JE+MgCO<sub>3</sub>.

No grupo das amina/amida as duas fontes testadas Feniletilamina (G4) e Putrescina (H4) foram estatisticamente diferentes entre os biorreatores, sendo que os maiores índices de metabolização foram para o biorreator contendo o meio MN+JE+MgCO<sub>3</sub>.

Na avaliação das miscelâneas três fontes foram testadas, apenas a fonte Éster metílico do ácido pirúvico (B1) não apresentou diferença entre os biorreatores e as

fontes Glicose-1-fosfato (G2) e D,L- $\alpha$ -Glicerol Fosfato (H2) foram estatisticamente diferentes.

Como pode ser observado na Tabela 3 de forma geral as fontes de C apresentaram maior metabolização no biorreator contendo o meio MN+JE+MgCO<sub>3</sub>

Segundo AQUARONE et al., (2008) o magnésio é um íon que atua como ativador de enzimas extracelulares e é um importante fator na esporulação de fungos. O magnésio pode ser utilizado como co-fator de enzimas, como também é essencial ao crescimento de alguns microrganismos.

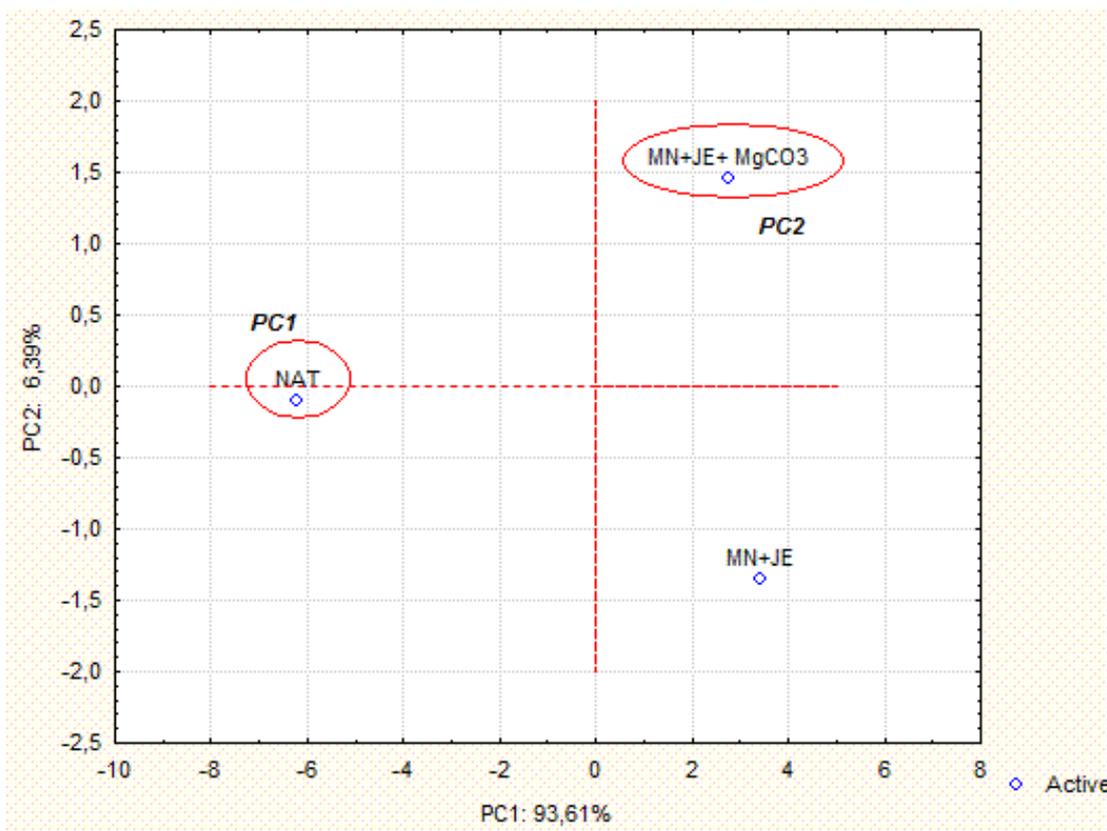
Na determinação do método Biolog os microrganismos precisam estar ativos em condições de laboratório e os perfis podem refletir na seleção de comunidades microbianas de rápido crescimento, criando uma dificuldade na relação dos dados obtidos *in vitro* com o funcionamento da comunidade em sistemas naturais, no entanto esse método pode ser usado como uma triagem na compreensão da relação entre a estrutura da comunidade e seu funcionamento (PRESTON-MAFHAM; BODDY; RANDERSON, 2002; MALUCHE-BARETTA, 2007).

#### *6.6 ANÁLISE DOS COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) DA UTILIZAÇÃO DAS FONTES DE CARBONO PELA COMUNIDADE MICROBIANA DA USINA GOIASA E DOS BIORREADORES CONTENDO OS MEIOS MN+JE E MN+JE+MgCO<sub>3</sub>.*

Na análise do índice de desenvolvimento de cor (WE) a comunidade microbiana do solo nativo da Usina Goiasa (NAT) e dos biorreatores contendo os meios (MN+JE) e (MN+JE+MgCO<sub>3</sub>) (Fig. 32) foram responsáveis por 93,61% da variância no Componente Principal 1 (PC1) e 6,39% da variância no PC2, totalizando 100% da variância total (PC1 e PC2).

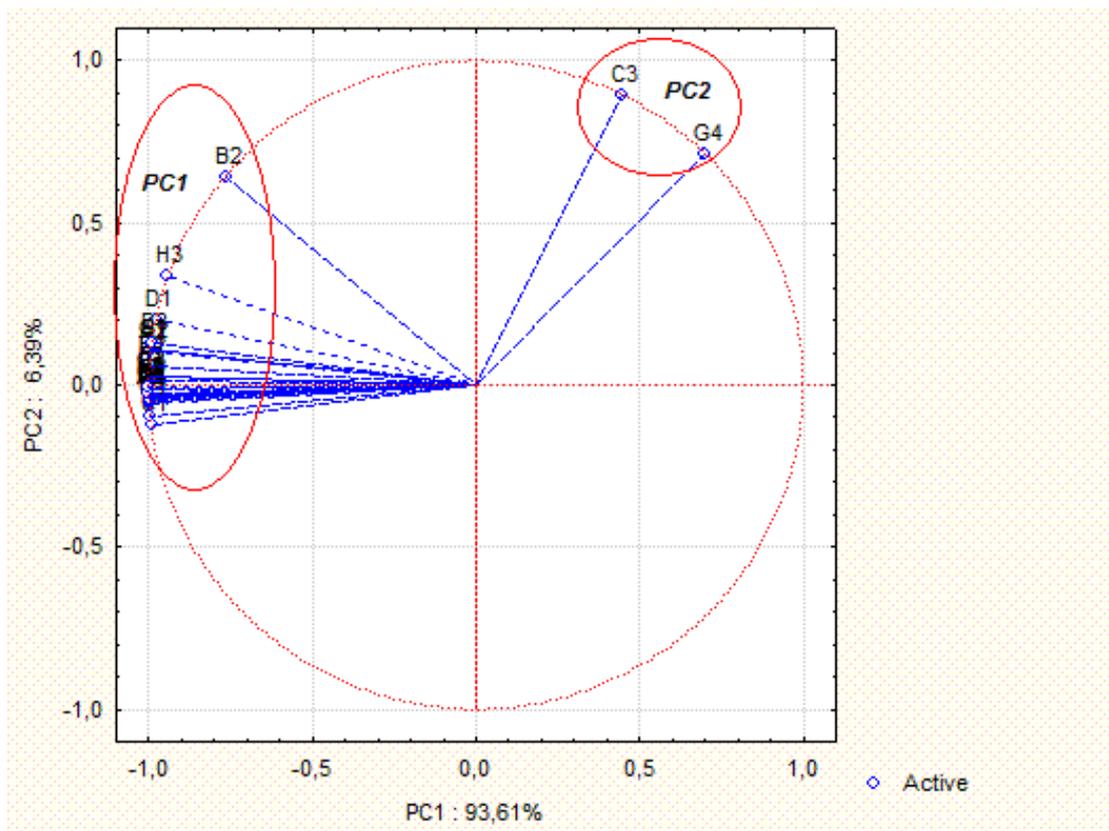
A amostra de solo identificada como solo nativo coletado na usina Goiasa (NAT-G) é explicada pelo PC1, ou seja, explicam 93,61%% da variância dos dados. Frente a análise dos componentes principais a amostra de solo nativo foi diferente das demais amostras dos biorreatores contendo os meios MN+JE e MN+JE+MgCO<sub>3</sub>. A amostra do biorreator contendo o meio MN+JE+MgCO<sub>3</sub> é explicado pelo PC2 (6,39%), o qual foi diferente das demais amostras (NAT e

MN+JE). De acordo com a análise de componentes principais a amostra NAT e MN+JE+MgCO<sub>3</sub> possuem seus dados explicados por PC1 e PC2 respectivamente, totalizando 100% da variância total.



**Figura 32** – Comunidade do solo Nativo da Usina Goiasa e dos Biorreatores MN+JE e MN+JE+MgCO<sub>3</sub>: gráfico da PCA com primeiro e segundo componente principal das amostras NAT (solo nativo da Usina Goiasa), MN+JE (Comunidade do biorreator com meio MN+JE) e MN+JE+MgCO<sub>3</sub> (Comunidade do biorreator com o meio MN+JE+MgCO<sub>3</sub>), baseados nos valores de absorvância do Biolog EcoPlate a 595 nm.

A Figura 33 evidencia as fontes de carbono que apresentaram maior metabolização, frente aos componentes principais de maior importância durante a análise, evidenciando neste trabalho PC1 e PC2. Como pode ser observado das 31 fontes de carbono utilizadas no teste 29 fontes apresentaram maior utilização pela comunidade microbiana presente no solo nativo e as fontes C3-Ácido 2-hidroxibenzóico e G4-Feniletilamina (PC2) apresentaram maior correlação pela comunidade do biorreator contendo o MN+JE+MgCO<sub>3</sub>.



**Figura 33** – Comunidade do solo Nativo da Usina Goiasa (NAT), Biorreator MN+JE e Biorreator MN+JE+MgCO<sub>3</sub>: PCA dos dois primeiros componentes principais para as 31 fontes de C, com base nos valores de absorvância do Biolog EcoPlate.

Como pode ser observado, a comunidade microbiana existente na amostra de solo nativo, obtido na Usina Goiasa apresentou-se diferente frente a capacidade de utilização das fontes de carbono, quando comparada com comunidade crescida no biorreator MN+JE+MgCO<sub>3</sub>. Entre os Biorreatores a presença de MgCO<sub>3</sub> apresentou uma capacidade de metabolização maior para o biorreator que suplementado com esse composto sugerindo que o MgCO<sub>3</sub> tenha atuado de forma positiva no crescimento da comunidade microbiana originária da amostra de solo, seja utilizado como um co-fator ou um íon essencial ao crescimento de alguns microrganismos, apresentando então uma maior diversidade metabólica e/ou a diversidade de microrganismos no biorreator suplementado com este tampão.

A Figura 33 mostra que das 31 fontes de carbono testadas 29 são explicadas pelo componente principal 1 (PC1) que está associado a comunidade microbiana do solo nativo da Usina Goiasa e apenas duas fontes C3 e G4 são explicadas pelo (PC2) que está associada a comunidade microbiana crescida no biorreator contendo

o meio MN+JE+ MgCO<sub>3</sub> (dados mostrados na figura 32). Como pode ser observado 93,61% dos dados são explicados pela comunidade microbiana do solo nativo da Usina Goiasa e que as comunidades microbianas proveniente do crescimento em biorreatores contendo meio o MN+JE e o meio MN+JE+ MgCO<sub>3</sub> apresentaram uma menor capacidade de metabolização das fontes de carbono testadas no Biolog Ecoplate, isso pode ter ocorrido possivelmente pela seleção de microrganismos que apresentaram a capacidade de serem cultivados pelos métodos tradicionais. Segundo Larkin (2003) como apenas uma pequena porcentagem de todos os microorganismos do solo são cultiváveis, os ensaios tradicionais baseados em cultura de populações microbianas ou estimativas brutas da biomassa ou a atividade microbiana fornecem informações bastante valiosas, nas comunidades complexas do solo.

Este estudo permitiu verificar os diferentes comportamentos das comunidades microbianas dos solos sob manejo da cana-de-açúcar, bem como na comunidade microbiana do solo sob vegetação nativa, por meio da avaliação do perfil metabólico dessas comunidades utilizando o método Biolog Ecoplate. Diferenças podem ser observadas pela análise multivariada (PCA) das áreas estudadas, sugerindo que este método de análise é adequado para este tipo de dados. O método Biolog também se mostrou sensível na avaliação do perfil metabólico da comunidade microbiana crescida em biorreatores e diferenças no perfil metabólico das comunidades podem ser observadas. Na prospecção de microorganismos em biorreatores foi observado que a suplementação com MgCO<sub>3</sub> apresentou um maior índice de metabolização na avaliação da diversidade metabólica utilizando Biolog Ecoplate, isso mostra que se faz necessário a suplementação do meio com um número maior de íons e compostos orgânicos, afim de que se possa fazer uma prospecção mais ampla da comunidade microbiana extraída do solo, melhorando sua diversidade metabólica.

## 7 CONCLUSÃO

A avaliação da densidade populacional dos micro-organismos do solo por meio da determinação das UFC g<sup>-1</sup> de solo, mostrou que as amostras de solo proveniente do manejo orgânico da Usina Jalles Machado e Usina Goiasa apresentaram o maior número de UFC g<sup>-1</sup> de solo.

A determinação do perfil metabólico da curva de desenvolvimento de cor média da placa com a amostra do solo nativo da Usina Jalles Machado, apresentou taxa de metabolização na fase exponencial após o período de 120 h de incubação.

Na análise de componentes principais pode ser observado que para os grupos testados a comunidade microbiana do solo nativo da Usina Jalles Machado foi determinada como componente principal 1 (PC1) em 5 dos 6 grupos testados (polímeros, carboidratos, ácidos carboxílicos, amina/amida e miscelâneas) exceto para o grupo dos aminoácidos, enquanto que a comunidade presente no solo nativo da amostra obtida na Usina Goiasa foi determinado como PC1 em 3 dos 6 grupos testados (polímeros, aminoácidos e miscelâneas). A comunidade do solo orgânico da Usina Jalles Machado foi determinada como PC1 apenas para ácidos carboxílicos e aminoácidos e a comunidade do solo convencional da Usina Jalles foi determinada como PC1 apenas para o grupo dos ácidos carboxílicos.

O meio que apresentou a maior taxa de crescimento celular foi o meio MN+JE, sendo utilizado posteriormente no biorreator para produção de biomassa. No controle do pH do biorreator utilizando K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, não ocorreu a correção do pH de forma eficiente. No tamponamento dos biorreatores utilizando MgCO<sub>3</sub>, NaOH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e KOH, não houve diferença na cinética de crescimento, no entanto foi observado um maior consumo de glicose no biorreator com suplementação de MgCO<sub>3</sub>.

As suspensões microbianas obtidas das amostras dos biorreatores com meio MN+JE e meio MN+JE+MgCO<sub>3</sub> com 36 horas de crescimento em biorreator foram aplicados em sistema Biolog Ecoplate e incubadas por 120h a ±25°C, a comunidade microbiana do biorreator com meio MN+JE foi capaz de metabolizar 12 fontes de carbono e a comunidade microbiana do biorreator com meio MN+JE+MgCO<sub>3</sub> foi capaz de metabolizar 27 das 31 fontes testadas.

A análise de componentes principais demonstrou que a comunidade do solo nativo da Usina Goiás se comportou diferente das amostras que foram crescidas em biorreatores com meios MN+JE e MN+JE+MGCO<sub>3</sub>. O PC1 (93,61%) foi explicado pela comunidade do solo da Usina Goiás e o PC2 (6,39%) foi explicado pela comunidade do biorreator MN+JE+MgCO<sub>3</sub>. A comunidade do biorreator MN+JE+MgCO<sub>3</sub> apresentou maior capacidade de metabolização comparada a comunidade do biorreator contendo o meio MN+JE, mostrando que o MgCO<sub>3</sub> atuou de forma positiva na capacidade de metabolização da comunidade microbiana extraída do solo nativo.

## 8 PERSPECTIVAS

Os estudos desenvolvidos ao longo da execução deste trabalho nos abriram perspectivas para aplicação biotecnológica dos micro-organismos. Dentre as possibilidades de expansão futura deste estudo, destacamos as seguintes:

- Metagenômica das amostras de solo nativo da Usina Goiasa e dos Biorreatores contendo os meios MN+JE e MN+JE+MgCO<sub>3</sub>;
- Isolamento dos micro-organismos da comunidade microbiana do solo nativo da Usina Goiasa;
- Cinética de crescimento dos micro-organismos isolados;
- Concentração da massa celular dos isolados e teste de viabilidade;
- Produção de consórcio microbiano e avaliação da Diversidade Metabólica;
- Testes de Recomposição ambiental de plantações de cana-de-açúcar nos manejos convencionais e orgânicos.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, T. J.A. DE; MONTEIRO, M.S.L. Modelo agrícola e desenvolvimento sustentável: a ocupação do Cerrado piauiense. **Amb. e Societ.**, v.8, p.1-18, 2005.

ALONSO-CASAJU´S, N.; DAUVILLE´E, D.; VIALE, A.M.; MUNˆOZ, F.J.; BAROJA-FERNANDEZ, E.; MORAN-ZORZANO, M.T.; EYDALLIN, G.; BALL, S. e POZUETA-ROMERO, J. Glycogen phosphorylase, the product of the glgP gene, catalyzes glycogen breakdown by removing glucose units from the non-reducing ends in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** v.188, p. 5266–5272, 2006.

AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W. e SCHIMIDELL, W. **Biotec. Ind.** v. I, São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2008.

AQUINO A. M. de; ASSIS, R. L. de. Agricultura orgânica e áreas urbanas e periurbanas com base na agroecologia. **Amb & Societ**, v. 10, n. 1, p. 137-150, 2007

ARAÚJO, R.; GOEDERT, W. J.; LACERDA, M. P.C. Qualidade de um solo sob diferentes usos e sob cerrado nativo. **Rev. Bras. de Ciênc. do solo**, v. 31, p. 1099-1108, 2007

ARAÚJO, A. S. F. de; MONTEIRO, R. T. R. Indicadores biológicos de qualidade dosolo. Uberlândia. **Biosc. Journ.** v.23, n.3. p. 66-75, 2007.

AZANIA, C.A.M. Comparação de métodos para determinar a seletividade de herbicidas na cultura da cana-de-açúcar. 2004, 116f. **Tese** (Doutorado em Agronomia / Produção 114 Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

BALOTA, E.B. ; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S.; DICK, R.P. Microbial biomass in soils under different tillage and crop rotation systems. **Biol. and Fertil. of Soils**, Braunschweig, v. 38, p. 15-20, 2003.

BANDOUNAS, L.; BALLERSTEDT, H.; WINDE, J. H.; RUIJSSENAARS, H.J. Redundancy in putrescine catabolism in solvent torelant *Pseudomonas putida* S12. **Jorn. of Biotec**, v. 154, p. 1-10, 2011.

BAZAES S.; TONCIO M.; LAIVENIEKS M.; ZEIKUS J.G.; CARDEMIL E. Comparative kinetic effects of Mn (II), Mg (II) and the ATP/ADP ratio on phosphoenolpyruvate carboxykinases from *Anaerobiospirillum succinici* producens and *Saccharomyces cerevisiae*. **Protein J.** v. 26, p. 265-269, 2007.

BLAKE J.D.; RICHARDS G.N. Problems of lactonization in the analysis of uronic acids. **Carbohydr. Res.**, v. 8, p. 275-281, 1968.

BOGNOLA, I. A.; CURCIO, G. R.; GOMES, J. B. V.; CAVIGLIONE, J. H.; UHLMANN, A.; CARDOSO, A.; CARVALHO, A. P. de. **Levantamento semidetalhado de solos do município de Londrina**. Londrina: IAPAR, 2011

BOSSIO, D.H., SCOW, K.M., Impact of carbon and flooding on the metabolic diversity of microbial communities in soils. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 61, p. 4043–4050, 1995.

BRACKIN, R.; ROBINSON, N.; LAKSHMANAN, P.; SCHMIDT, S. Microbial function in adjacent subtropical forest and agricultural. **Soil Biol. & Bioch.** v. 57, p. 68-77, 2013.

BUEDENBENDER, S.; SCHULZ, G. E. Structural Base for Enzymatic Cyclodextrin Hydrolysis. **J. Mol. Biol.** v. 385, p. 606-617, 2009.

CHEN, F.; ZHENG, H.; ZHANG, K.; OUYANG, Z.; LAN, J.; HUAILIN, L.; QIAN S. Changes in soil microbial community structure and metabolic activity following conversion from native *Pinus massoniana* plantations to exotic *Eucalyptus* plantations. **For. Ecol. and Manag.** v. 291, p. 65-72, 2013.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira : cana-de-açúcar, Terceiro levantamento, dezembro/2012 - **Companhia Nacional de Abastecimento.** – Brasília : Conab 2013.

CONTINEANU, M.; CONTINEANU, I.; NEACSU, A.; PERISANU, ST.; “The effect of  $\gamma$  rays upon monohydrated asparagine. A DSC study”, *Rad. Phys. Chem.* v.79, p.1047–1051, 2010.

CORREIA, M. E. F.; OLIVEIRA, L. C. M. de. Fauna de Solo: Aspectos Gerais e Metodológicos. **Documentos 112**, Seropédica, EMBRAPA, 46p, 2000.

COSTA, A. A.; GOEDERT, W.J.; SOUZA, D. M. G. Qualidade de solo submetido a sistemas de cultivo com preparo convencional e plantio direto. **Pesq. Agrop. Bras.** v. 41, n. 7, p. 1185-1191, jul., 2006.

DALMONECH, D., LAGOMARSINO, A., MOSCATELLI, M.C., CHITI, T., VALENTINI, R., Microbial performance under increasing nitrogen availability in a Mediterranean forest soil. **Soil Biol. Biochem.** V.42, p. 1596–1606, 2010.

DAUVILLÉE D, KINDERF IS, LI Z, KOSAR-HASHEMI B, SAMUEL MS, RAMPLING L, BALL S & MORELL MK. Role of the *Escherichia coli* glgX gene in glycogen metabolism. **J Bacteriol.** v. 187, p. 1465–1473, 2005.

DEGENS. , B.P., SCHIPPER, L.A., SPARLING, G.P., DUNCAN, L.C, Is the microbial community in a soil with reduced catabolic diversity less resistant to stress or disturbance?. **Soil Biol. Biochem.** v. 33, p.1143–1153, 2000.

DOMINY, C.S., HAYNES, R.J., VAN ANTWERPEN, R. Loss of soil organic matter and related soil properties under long-term sugarcane production on two contrasting soils. **Biol.and Fert. of Soils.** v. 36, p. 350-356, 2002

DUTRA, F.; BECHARA, E.J.H. BIOQUÍMICA E AÇÃO CITOTÓXICA DE  $\alpha$ -AMINOCETONAS ENDÓGENAS. **Quim. Nova**, v. 28, n.3, p. 483-491, 2005.

EGGLESTON, G., LEGENDRE, B. L., & TEW, T. Indicators of freeze damaged sugarcane varieties which can predict processing problems. **Food Chem.** v.87, n.1, p. 119–133, 2004

ELLIOTT WH. The estimation of aminoacetone and 5-aminolaevulic acid. **Biochem. J.** v. 74, p. 90–94, 1960.

ELSHAFEI, A.M.; ABDEL-FATAH, O.M. Evidence for a non-phosphorylated route of galactose breakdown in cell-free extracts of *Aspergillus niger*, **Enz. and Micro. Techn.** v. 29, p. 76-83, 2001.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema Brasileiro de classificação de solos**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos. 412 p. 1999.

EYDALLIN G, VIALE AM, MOR´AN-ZORZANO MT, MUˆNOZ FJ, MONTERO M, BAROJA-FERNANDEZ E & POZUETA-ROMERO J. Genome-wide screening of genes affecting glycogen metabolism in *Escherichia coli* K-12. **FEBS Lett.** v.581, p. 2947–2953, 2007

FERRON, P. Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*. In “Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970- 1980” (H. D. Burges, Ed.) **Acad. Press**, London, p. 465-482, 1981

FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, J. C. Polímeros biodegradáveis: uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Quím. Nova**, v. 29, n. 4, p. 811-816, 2006.

GÄNZLE, M.G.; HAASE. G.; JELEN. P. Lactose: crystallization, hydrolysis and value added derivatives. **Int. Dairy J.** v. 18, p.685–94, 2008.

GARLAND, J. L.; MILLS, A. L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns on community-level, sole-carbon-source utilization. **App. and Environ. Microb.** New York, v. 57, p. 2351-2359, 1991.

GOLÇALVES, H.M.; BORGES, J.D.; SILVA, M.A.S. Acúmulo De Metais Pesados E Enxofre No Solo Em Áreas De Influência De Canais De Vinhaça De Fertirrigação. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 25, n. 6, p. 66-74, 2009.

GRAHAM, M.H.; HAYNES, R.J. Catabolic diversity of soil microbial communities under sugarcane and other land uses estimated by Biolog and substrate-induced respiration methods. **Appl. Soil Ecol.** v. 29, p. 155–164, 2005.

GRAYSTONE, S.J., CAMPBELL, C.D., VAUGHAN, D.; Microbial diversity in the rhizospheres of different tree species. In: Khanna, M., Stotzky, G., 1992. Transformation of *Bacillus subtilis* Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, W.S.R., Grace, P.R. by DNA bound on montmorillonite and effect of DNase on the (Eds.), Soil biota — Management in Sustainable Farming transforming ability of bound DNA. **Appl. Environ. Microbiol. Systems**, CSIRO Press, Adelaide, p. 155–157, 1994.

GUAGLIUMI, P., MARQUES, E.J., VILAS BOAS, A M. Contribuição ao estudo da cultura e aplicação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin no controle da cigarrinha da folha *Mahanarva posticata* (Stal.) no nordeste o Brasil. Recife: **Boletim Técnico** n. 3. CODECAP, 56 p., 1974.

GUIMARÃES, P. M.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. **Biotechnol. Adv.** v. 28, n.3, p.375-84, 2010

HAIFANG, Z.; GANG, L.; XIAOLONG, S.; DIANLIN, Y.; YUJIE, L.; JIANG, Q.; JINGNI, Z.; SHULAN, Z. Changes in soil microbial functional diversity under different vegetation restoration patterns for Hulunbeier Sandy Land. **Acta Ecol. Sin.**, v. 33, p. 38–44, 2013.

HALL, R. D. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. **New Phytol.** Cambridge, v. 169, p. 453-468, 2006

Hazardous Substances Data Bank (HSDB) - **National Library of Medicine's TOXNET system** - <http://toxnet.nlm.nih.gov> acesso em: November 25, 2012. Palavra chave: 4-HYDROXYBENZOIC ACID, 2012.

HILL, G.T., MITKOWSKI, N.A., ALDRICH-WOLFE, L., EMELE, L.R., JURKONIE, D.D., FICKE, A., MALDONADO-RAMIREZ, R., LYNCH, S.T. e NELSON, E.B. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. **Appl. Soil Ecol.** v. 15, p. 25-36, 2000.

HUANG, H.Y.; ZHOU, P.; SHI, W.W.; LIU, Q.L.; WANG, N.; FENG, H.W.; ZHI, Y.E. Microbial Functional Diversity in Facilities Cultivation Soils of Nitrate Accumulation. **Proc. Environ. Scien.** v. 13, p. 1037 – 1044, 2012.

IWAMOTO, T., TANI, K., NAKAMURA, K., SUZUKI, Y., KITAGAWA, N., EGUCHI, M., NASU, M. Monitoring impact of in situ biostimulation treatment on groundwater bacterial community by DGGE. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v.32, p. 129– 141, 2000.

JANNICHE, G.S.; SPLIID, H.; HANS-JØRGEN ALBRECHTSEN, H. Microbial Community-Level Physiological Profiles (CLPP) and herbicide mineralization potential in groundwater affected by agricultural land use. **J. of Contam. Hydrol.** v.140-141, p. 45-55, 2012.

JANNOURA, R.; BRUNS, C.; JOERGENSEN, R.G. Organic fertilizer effects on pea yield, nutrient uptake, microbial root colonization and soil microbial biomass indices in organic farming systems. **Europ. J. Agron.** v. 49, p. 32– 41, 2013.

JOHAN, M.H.S.; JOHN, D. W.; MASON, P. Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. **Trends In Plant Scien.**, v. 1, n. 5, p. 1360 – 1385, 1996.

JOHNSON, M. J.; LEE, K. Y.; SCOW, K. M. DNA fingerprint reveals links among agricultural crops, soil properties, and the composition of soil microbial communities. **Geoderma**, Amsterdam, v. 114, n. 3/4, p. 279-303, 2003.

KAUTOLA H, VAHVASELKA M, LINKO YY, LINKO P. Itaconic acid production by immobilized *Aspergillus terreus* from xylose and glucose. **Biotechnol. Lett.** v. 7, p. 167-172, 1985.

KOLLENGODE, A. N. R; HANNA, M. A. Cyclodextrin Complexed Flavors Retention in Extruded Starches. **J. of Food Scien.** v. 62, n. 5, p.1057- 1060, 1997

KORAKLI, M.; VOGEL, R.F. Purification and characterisation of mannitol dehydrogenase from *Lactobacillus sanfranciscensis*. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 220, p. 281-286, 2003.

KUBOTA, K.; YOKOZEKI,K.; OZAKI, H. Effects of L-serine dehydratase activity on L-serine production by *Corynebacterium glycinophilum* and an examination of the properties of the enzyme, **J. of Ferment. and Bioeng.** v. 67, p. 391–394, 1989.

LANDETE, J.M; ARENA, M.E.;PARDO, I.; M.C. MANCA DE NADRA, M.C.; FERRER, S. Comparative survey of putrescine production from agmatine deamination in different bacteria, **Food Microbiol.** v. 25, n. 7, p. 882–887, 2008.

LARKIN, R. Characterization Of Soil Microbial Communities Under Different Potato Cropping Systems By Microbial Population Dynamics, Substrate Utilization Anf Fatty Acid Profiles. **Soil Biol. and Bioch.**, Oxford, v. 35, p. 1451-1466, 2003

LEE, P.C.; LEE,W.G.;. KWON, S.; LEE, S.Y.; CHANG.H.N. Succinic acid production by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*: effects of the H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> supply and glucose concentration. **Enzyme Microbial. Technol.**, v. 24, p. 549–554, 1999.

LENG, Y.; ZHENG, P.; SUN, Z. Continuous production of L-phenylalanine from phenylpyruvic acid and L-aspartic acid by immobilized recombinant *Escherichia coli*/SW0209-52. **Proc. Biochem.** v. 41, p. 1669-1672, 2006.

LI, F.; LIU, M.; LI, Z.; JIANG ,C.; HAN, F.; CHE, Y.Changes in soil microbial biomass and functional diversity with a nitrogen gradient in soil columns. **Appl Soil Ecol.** v. 64, p. 1-6, 2013.

LI, J.; JIANG, M.; CHEN,K.Q.; SHANG,L.A.; WEI,P.; YING,H.J.; YE, Q.; OUYANG, P.K.; CHANG, H.N.; Enhanced production of succinic acid by *Actinobacillus succinogenes* with reductive carbon source. **Proc. Biochem.** v. 45 p. 980–985, 2010.

LIU, Z.; ZENG, G.; WANG, J.; ZHONG, H.; YING DING, Y.; YUAN, X. Effects of monorhamnolipid and Tween 80 on the degradation of phenol by *Candida tropicalis*. **Proc. Biochem.** v. 45, p. 805–809, 2010.

LIU,Y.P.; ZHENG, P.; SUN, Z.H.; NI, Y.; DONG, J.J.; WEI P.; Strategies of pH control and glucose-fed batch fermentation for production of succinic acid by *Actinobacillus succinogenes* CGMCC1593. **Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 83, p. 722–729, 2008.

LOPEZ, A.; LLINARES, F.; CORTELL, C. & HERRAEZ, M. Comparative enhancer effects of Span 20 with Tween 20 and Azone on the in vitro percutaneous penetration

of compounds with different lipophilicities. **Int. J. Pharmacol.**, v. 202, p. 133–140, 2000.

MAIJALA, R.; NURMI, E.; FISCHER, A. Influence of processing temperature on the formation of biogenic amines in dry sausages. **Meat Sci.**, Amsterdam, v. 39, n. 1, p. 9-22, 1995.

MALINGRE M.M., SCHELLENS J.H., VAN TELLINGEN O, OUWEHAND M., BARDELMEIJER H.A., ROSING H., KOOPMAN F.J., SCHOT M.E., TEN BOKKEL HUININK W.W. & BEIJNEN J.H. The co-solvent Cremophor EL limits absorption of orally administered paclitaxel in cancer patients. **Br. J. Cancer**, v. 85, p. 1472–1477, 2001

MALUCHE-BARETTA, C.R.D. Diversidade microbiana em solos sob florestas de *Araucaria angustifolia* – Carolina Riveira Duarte Maluche-Baretta – **Tese** (Doutorado) Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz. USP , Piracicaba, 184p. 2007.

MARASCO . R.; LAGO, C.T.; AND FELICE M. Utilization of cellobiose and other -D-glucosides in *Agrobacterium tumefaciens*. **Res. Microbiol.**, p. 146, 485-492, 1995.

MARTENS, H., NAES, T. – **Multivariate calibration**, New York: John Wiley, 441p., 1989.

MONTERO M, EYDALLIN G, ALMAGRO G, MUNOZ F.J., VIALE AM, RAHIMPOUR M, SESMA MT; BAROJA-FERN´ANDEZ E.; POZUETA- ROMERO J. Escherichia coli glycogen metabolism is controlled by the PhoP–PhoQ regulatory system at submillimolar environmental Mg<sup>2+</sup> concentrations, and is highly interconnected with a wide variety of cellular processes. **Biochem J.** v. 424, p. 129–141, 2009.

NELSON, D. L.; COX, M.M.; **Lehninger Principles of Biochemistry**. Ed. 5, 1.100p., 2011.

NIIMI, M. ; TOKUNAGA, M. AND NAKAYAMA, H. Regulation of mannitol catabolism in *Candida albicans*: evidence for cyclic AMP-independent glucose effect. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 24, n. 3 , p. 211-217, 1986.

OWEN, A.G.; IONES, D.L.. Competition for amino acids between wheat roots and rhizosphere microorganisms and role of amino acids in plant N acquisition. **Soil Biol. and Biochem.** v. 33, p. 651-657, 2001.

PARTELLI, F. L. **Café: microbiologia, nutrição, fisiologia e bioquímica**. Editora UFG, Goiânia, p. 174, 2009,

PENGTHAMKEERATI, P., MOTAVALLI, P.P., KREMER, R.J. Soil microbial activity and functional diversity changed by compaction, poultry litter and cropping in a claypan soil. **Appl. Soil Ecol.** v. 48, p. 71–80, 2011.

PEZZOTTI, F.; THERISOD, H.; THERISOD, M. Enzymatic synthesis of D-glucosaminic acid from D-glucosamine. **Carbohydr. Res.** v. 340, p. 139–141, 2005.

PIGNATARO, A., MOSCATELLI, M.C.; MOCALIA, S. GREGOD, S.; BENEDETTI, A. Assessment of soil microbial functional diversity in a coppiced forest system. **Appl. Soil Ecol.**, v. 62, p. 115– 123, 2012.

PRESTON-MAFHAM; J., BODDY, L.; RANDERSON, P.F. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles – a critique. **FEMS Microbiol. Ecol.** v. 42, p. 1–14, 2002.

REDZEPOVIC,S., ORLIC, S., MAJDAK,A., KOZINA, B., VOLSCHENK, H., VILJOEN-BLOOM, M. Differential malic acid degradation by selected strains of *Saccharomyces* during alcoholic fermentation. **Internat. J. of Food Microb.**, v. 83, p. 49–61, 2003.

REGAZZI, A.J. **Análise multivariada**, notas de aula INF 766, Departamento de Informática da Universidade Federal de Viçosa, v.2, 2000.

ROLING, W.F.M., VAN BREUKELEN, B.M., BRASTER, M., GOELTOM, M.T., GROEN, J., VAN VERSEVELD, H.W. Analysis of microbial communities in a landfill leachate polluted aquifer using a new method for anaerobic physiological profiling and 16S rDNA based fingerprinting. **Microb. Ecol.**, v.40, p. 177–188, 2000.

RUBIO-TEIXEIRA, M.A. Comparative analyses of the Gal genetic switch between not-so distant cousins- *Saccharomyces cerevisiae* versus *Kluyveromyces lactis*. **FEMS Yeast Res.**, v. 5, p. 1115-1128, 2005.

SALOMO, S.; MÜNCH, C.; RÖSKE, I. Evaluation of the metabolic diversity of microbial communities in four different filter layers of a constructed wetland with vertical flow by Biolog analysis, **Water Res.**, n. 43, p. 4569 – 4578, 2009.

SARGARI, F.J.; AGÜERO, J.; GARCIA-LOBO, J.M. The genes for erythritol catabolism are organized as an inducible operon in *Brucella abortus*. **Microb.**, v. 146, p. 487-495, 2000.

SASAKI, T. Production and properties of erythritol obtained by *Aureobasidium* fermentation. **J. Agri. Chem.** Nippon Nogeikagaku Kaishi v. 63, n. 6, p. 1130-1132, 1989.

SCARPARE, F.V. Simulação do crescimento da cana-de-áçúcar pelo modelo agrohidrológico SWAP/WOFOST. Piracicaba, 2011. **Tese** (Doutorado) Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz. USP, Piracicaba, 2011.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. **Toxicon.** v.56, p. 1267-1274, 2010

SIGGINS, A.; GUNNIGLE, E.; ABRAM, F. Exploring mixed microbial community functioning: recent advances in metaproteomics. **FEMS Microbiol. Ecol.** v. 80, p. 265–280, 2012.

SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: Derivados Hidrossolúveis, Aplicações Farmacêuticas E Avanços. **Quim. Nova**. São Paulo, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.

SOIL SCIENCE SOCIETY OF AMERICA. **Defining soil quality for a sustainable environment**. Special Publication, 35. Madison, ed. 35, p. 37-51, 1994.

SONG, H., LEE, J.W., CHOI, S., YOU, J.K., HONG, W.H., AND LEE, S.Y., "Effects of dissolved CO<sub>2</sub> levels on the growth of *Mannheimia succiniciproducens* and succinic acid production", **Biotechnol. Bioeng.**, v. 98, n. 6, p. 1296-1304, 2007

TIEDJE, J. M.; CHO, J. C.; MURRAY, A.; TREVES, D.; XIA, B.; AHOU, J. Soil teeming with life: new frontiers for soil science. In: REES, R. M.; BALL, B. C.; CAMPEBELL, C. D.; WATSON, C. A. (Org.). **Sustainable management of soil organic matter**. Wallingford: CAB International, p. 393-412, 2001

VALIX, M; LOON, L. O. Adaptative tolerance behavior of fungi in heavy metals, **Miner. Engin.**, v. 16, p. 193-198, 2003.

VEZZANI, F.M. & MIELNICZUK, J. Uma visão sobre qualidade do solo. **R. Bras. Cienc. Solo**, v. 33, p. 743-755, 2009.

WEBB, S.R.; LEE, H. "Regulation of B-xylose Utilization by Hexoses in Pentose-fermenting Yeasts." **Biotechnol. Adv.** v. 8; p. 685-697, 1990.

WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S. Microbial Conversion of D-Xylose to Xylitol, Review. **J. of Ferment. and Bioeng.**, v. 86, n. 1, p. 1-14. 1998.

XUE-MEI, H.; REN-QING, W.; JIAN, L.; MENG-CHENG, W.; JUAN, Z.; WEI-HUA, G. Effects of vegetation type on soil microbial community structure and catabolic diversity assessed by polyphasic methods in North China. **J. of Environ. Scien.**, v. 19, p. 1228–1234, 2007.

YANG ST, SILVA EM. Novel products and newtechnologies for use of a familiar carbohydrate, milk lactose. **J. Dairy Sci.** v. 78, p. 2541–62, 1995.

YINGHUA , X.; JIAN, S.; QING, L.; JING, M.; YINGWU, S.; KAI,L. Effects of a surface wildfire on soil nutrient and microbial functional diversity in a shrubbery. **Acta Ecol. Sin.**, v. 32, p. 258–264, 2012.

YU-HONG, Y. DONG-MEI, C.; JIN YAN.; HAI-BIN, W.; YU-QI. D.; XU-KUI, G.; HAI-BIN, H.; WEN-XIONG, L. Effect of Different Fertilizers on Functional Diversity of Microbial Flora in Rhizospheric Soil Under Tobacco Monoculture. **Acta Agron. Sin.**, v. 37, p. 105–111, 2011.

ZAK, J.C., WILLIG, M.R., MOORHEAD, D.L.; WILDMAN, H. G. Functional diversity of microbial communities: A quantitative approach. **Soil Biol. Biochem.**, v. 26, p. 1101–1108, 1994.

ZHANG D, ZHU L. Effects of Tween 80 on the removal, sorption and biodegradation of pyrene by *Klebsiella oxytoca* PYR-1. **Environ. Pollut.**, v. 74, p.164-169, 2012.

ZHANG, B., DENG, H., WANG, H.L., YIN, R., HALLETT, P.D., GRIFFITHS, B.S., DANIELL, T.J. Does microbial habitat or community structure drive the functional resilience of microbes to stress in severely degraded soils restored with different plant species? **Soil Biol. and Biochem.**, v. 42, p. 850-859, 2010.

ZHANG, B.; WANG, H.; YAO, S.; BI, L. Litter quantity confers soil functional resilience through mediating soil biophysical habitat and microbial community structure on an eroded bare land restored with mono *Pinus massoniana*. **Soil Biol. e Bioch.**, v. 57, p. 1-12, 2012.

ZHANG, C.; KE,S.; WANG, J.; GE, Y.; CHANG, S.X.; ZHU, S.; CHANG, J. Responses of microbial activity and community metabolic profiles to plant functional group diversity in a full-scale constructed wetland, **Geoderma**, v. 160, p. 503–508, 2011.

ZHAO, Y.; LI, J.; WANG, Z.; YAN, C.; WANG, S.; ZHANG, J. Influence of the plant development on microbial diversity of vertical-flow constructed wetlands. **Biochem. System. and Ecol.**, v. 44, p. 4–12, 2012.

ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; COUTINHO, H. L. C.; NEVES, M. C. P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cad. de Ciênc. e Tecn**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 391-411, 2003.