

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO**

**EFEITO DO CALCÁRIO EM ATRIBUTOS
BIOLÓGICOS DO SOLO**

TESE DE DOUTORADO

Ecila Maria Nunes Giracca

Santa Maria, RS, Brasil

2005

**EFEITO DO CALCÁRIO EM ATRIBUTOS BIOLÓGICOS
DO SOLO**

por

Ecila Maria Nunes Giracca

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de
Pós-Graduação em Ciência do Solo, Área de Concentração em
Biodinâmica e Manejo do Solo, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM),
como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciência do Solo.

Orientador: Prof. Flávio Luiz Foletto Eltz

Santa Maria, RS, Brasil

2005

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

EFEITO DO CALCÁRIO EM ATRIBUTOS BIOLÓGICOS DO SOLO

elaborada por
Ecila Maria Nunes Giracca

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciência do Solo

COMISSÃO EXAMINADORA:

Flávio Luiz Foletto Eltz, PhD.
(Presidente/Orientador)

Julio César Pires dos Santos, Dr. (UDESC)

Sandra Beatriz Vicenzi Fernandes, Dr. (UNIJUI)

Zaida Ines Antonioli, Dr. (UFSM)

Telmo Jorge Carneiro Amado, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 28 de fevereiro de 2005.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Flávio Luiz Foletto Eltz, pela orientação, mas acima de tudo pela amizade que proporcionou durante esses anos de convivência.

À professora Zaida Antonioli, um agradecimento muito especial, pelo estímulo, orientação e auxílio na execução do trabalho.

Ao Professor Telmo Amado, componente do Comitê de Orientação, pela amizade e contribuições técnicas.

Aos bolsistas Ricardo Bemfica Steffen, Eliziane Benedetti, Eloisa Lasta e Mirla Weber Tatiana Benedetti, pelo auxílio na execução deste trabalho.

A Tarciso Uberti, secretário do PPGCS, Flavio Silveira e Gládis Uberti, secretários do Departamento de Solos pela convivência, apoio e auxílio em questões burocráticas.

Ao Departamento de Solos, pela liberação para realização do curso.

À minha família, um agradecimento muito especial pelo apoio constante e compreensão.

SUMÁRIO

RESUMO	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
CAPÍTULO I – INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO DE CALCÁRIO NA POPULAÇÃO DE ARTHROPODA E OLIGOCHAETA EM SOLO SOB PLANTIO DIRETO	
1.1 INTRODUÇÃO.....	12
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
1.4 CONCLUSÕES.....	24
1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
CAPÍTULO II - INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO E QUANTIDADE DE CALCÁRIO NA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS NITRIFICADORAS	
2.1 INTRODUÇÃO.....	30
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
2.4 CONCLUSÕES.....	43
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
CAPÍTULO III - ESTUDO MOLECULAR DE DUAS ESPÉCIES DE OLIGOQUETAS PRESENTES NO SISTEMA DE PLANTIO DIRETO	
3.1 INTRODUÇÃO.....	47
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	51
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53

3.4 CONCLUSÕES.....	55
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Ciências do Solo
Universidade Federal de Santa Maria

EFEITO DO CALCÁRIO EM ATRIBUTOS BIOLÓGICOS DO SOLO

AUTORA: ECILA MARIA NUNES GIRACCA
ORIENTADOR: FLÁVIO LUIZ FOLETTTO ELTZ
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 18 de março de 2005

O solo é um sistema complexo composto de seres vivos, ar, água, matéria orgânica e minerais que interagem. Neste sentido os organismos do solo, além de habitantes, são parte integrante de sua composição. No solo, a atividade agrícola que geralmente inicia como área natural, com muitas espécies de plantas e animais convivendo em equilíbrio, pode passar a uma redução da biodiversidade, decorrentes das práticas culturais. O presente estudo foi realizado em três etapas visando avaliar e caracterizar a composição faunística, a população de bactérias nitrificadoras e desenvolver um protocolo de extração de DNA para oligoquetas. A avaliação faunística e da população de bactérias nitrificadoras foi realizada em um experimento com cinco anos de plantio direto com os seguintes tratamentos: A) testemunha (sem calcário); B) quantidade recomendada pelo método SMP para pH 6,0 (100%), incorporada ao solo na profundidade de 20 cm; C) quantidade recomendada pelo método SMP para pH 6,0 (100%), distribuída na superfície do solo; D) metade da quantidade recomendada pelo método SMP para pH 6,0 (50%), distribuída na superfície do solo; E) um quarto da quantidade recomendada pelo método SMP para pH 6,0 (25%), distribuída na superfície do solo. Para avaliação da população da meso e macrofauna, foram coletadas amostras em julho (inverno) e dezembro (verão) de 2001. Para meso e macro organismos epiedáficos foram instaladas armadilhas de captura, e para macrorganismos euedáficos foram coletados monólitos de solos. As amostras coletadas foram, acondicionadas em caixas de isopor e levadas ao Laboratório de Biologia do Solo do Departamento de Solos da UFSM. Posteriormente, foi realizada a separação, contagem e classificação de grupos taxonômicos em nível de classe e ordem. Utilizou-se o índice de diversidade de Shannon (H) para avaliação das populações e para comparação, as médias nos diferentes tratamentos entre as doses e modos e aplicação de calcário através do teste Tukey a 5%. As doses e modo de aplicação de calcário em sistema de plantio direto após 5 anos foram fatores menos determinantes do que as condições climáticas (inverno-verão) na abundância e riqueza da fauna edáfica. A população de organismo mais representativa foi de colembola. A determinação quantitativa de população de bactérias nitrificadoras foi através da semeadura do solo dispersado sobre uma camada de sílica gel e posterior adição de uma mistura composta por calcário, silicatos alcalinos e uma mistura ácida, que contem os nutrientes específicos para o desenvolvimento do grupo bacteriano em estudo. O experimento foi realizado em plaqueamento triplicado com 25 mg de amostra de solo por placa. Após 10 dias de incubação a 28-30° C foram realizadas observações e contagens das colônias desenvolvidas nas placas, realizadas a cada 5 dias por um período de 60 dias. As aplicações de calcário 100% na superfície, 100% incorporada e 50% na superfície não diferiram significativamente no número de colônias de bactérias nitrificadoras. O pH inferior a 4,3 nos tratamentos 0% e 25% de calcário na superfície diminuiu a população de bactérias nitrificadoras. As oligoquetas, para o trabalho de desenvolvimento de um protocolo de extração de DNA, foram coletadas no experimento citado acima. Após caracterização visual de grupos idênticos, 10 indivíduos de cada espécie de *Eisenia foetida* e *Pheretima* sp. foram caracterizadas segundo padrões morfológicos. Outros 10 indivíduos foram abertos e retirado todo o material existente no seu interior. Posteriormente o material foi submetido à maceração e extração do DNA. O DNA extraído foi visualizado em gel de agarose 1,2%. O protocolo desenvolvido foi eficiente para extração de DNA em *Eisenia foetida* e *Pheretima* sp.

Palavras-chave: plantio direto, mesofauna, nitrificadores, DNA

ABSTRACT

Doctorate Thesis
Federal University of Santa Maria

Lime effect on soil biological attributes

Author: Ecila Maria Nunes Giracca
Advisor: Flávio Luiz Foletto Eltz
Date and place of defense: Santa Maria, March 18th 2005.

The soil is a complex system composed by live organisms, organic matter, gases, water and minerals parts that interact. In this sense, the soil organisms, besides inhabitants, are part of its composition. In the soil, the agricultural activity normally begin in a natural area, with several species of plants and animals living in equilibrium, may pass to a reduction of biodiversity, in function of agricultural practices. The present study was carried out in phases, aiming to evaluate and characterize the faunal composition, the population of nitrifying bacteria, and to develop a protocol to extract earthworms DNA. The faunal composition and nitrifying bacteria, population was done in an experiment with five years of no-till with the following treatments: a) witness (without lime); b) amount indicated by SMP method to pH 6.0 (100%), incorporated to soil in 20 cm depth; c) amount indicated by SMP method to pH 6.0 (100%), distributed in soil surface; d) half of the amount indicated by SMP method to pH 6.0 (50%), distributed in soil surface; and e) one quart of the amount indicated by SMP method to pH 6.0 (25%), distributed in soil surface. To evaluate the population of soil meso and macrofauna were collected samples in July (winter) and December (summer) of 2001. For epiedafic meso and macro organisms were installed traps for capture, and for euedafic macro organisms, were collected soil monoliths. The samples collected individually were placed in plastic bags, packed in thermo boxes and taken to Soil Biology Laboratory of UFSM Soils Department. Later, were performed separation, counting and classification of taxonomic groups in level of classes and order of the organisms? Were utilized the Shanon Diversity Index (H) to evaluate the population among the treatments and the Tukey test ($P=0.05$) to compare the means of population in the different doses and mode of lime application. The doses and mode of lime application in no-till after 5 years were not a significant factor to affect the abundance and richness of soil fauna. The most representative population of organisms was Collembola. The quantitative determination of bacteria nitrifying population was performed with seeding of dispersed soil over a layer of silica gel and later addition of a mix composed of lime, alkaline silicates and an acid mixture, that became neutral forming a second layer of silica gel that contains the nutrients specific to the growth of the bacteria group studied. The experiment was performed in triplicates with 25 mg of soil samples per plaque. After 10 days of incubation in 28-30°C were done observations and counting of the colonies developed in each plaque, presuming that each bacteria formed one colony. The counting was done every 5 days for a period of 60 days. The application of 100% lime, incorporated or on soil surface, and 50% of lime on soil surface did not were significantly different in the number of colonies of nitrifying bacteria. The pH under 4.3 in the treatments witness and 25% of lime on soil surface affected negatively the bacteria population in depths 0-5 and 5-10 cm. To develop a protocol to extract DNA of earthworms, earthworms were collected in the experiment of doses and mode of lime application in the no-till system, in the experimental area of UFSM Soils Department. After visual characterization of identical groups, 10 individuals of each specie of *Eisenia foetida* and *Pheretima* spp were placed in alcohol 70% for later characterization after morphological patterns of each specie. Other 10 individuals were open and taken all materials from its interior. Before DNA extraction, the material stayed in sterilized water for 24 hours in refrigerator to eliminate any substances that may be stayed glued to the material. Later, the material was macerated and the DNA extracted. The DNA extracted was visualized in agarose gel 1.2%. The protocol developed was efficient to extract the DNA of *Eisenia foetida* and *Pheretima* spp.

Key words: no-till, mesofauna, DNA, nitrifying bacteria.

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

TABELA 1 - Diversidade e frequência da fauna epiedáfica em solo calcariado em sistema de plantio direto sobre pastagem nativa, após 5 anos de cultivo, coleta inverno 2001, Santa Maria, RS 19

TABELA 2 - Diversidade e frequência da fauna epiedáfica em solo calcariado em sistema de plantio direto sobre pastagem nativa, após 5 anos de cultivo, coleta verão, 2001 Santa Maria, RS 22

CAPITULO II

TABELA 1 - Número de colônias de bactérias nitrificadoras e pH do solo em diferentes tratamentos com aplicação de calcário, Santa Maria, RS. 38

TABELA 2 - Teores de fósforo, potássio, cálcio, magnésio, matéria orgânica, e alumínio em diferentes modos de aplicação de calcário, Santa Maria, RS. 42

LISTAS DE FIGURAS

CAPITULO I

FIGURA 1 - Abundância e riqueza de grupos taxonômicos de organismos epiedáficos em solo calcariado em sistema de plantio direto sobre pastagem nativa, após 5 anos de cultivo, Santa Maria, RS..... 23

FIGURA 2 - Abundância de grupos taxonômicos de organismos euedáficos, em solo calcariado em sistema de plantio direto sobre pastagem nativa, após 5 anos, Santa Maria, RS..... 24

FIGURA 3 - Grupo de organismos da macrofauna nos diferentes tratamentos em solo calcariado em sistema de plantio direto sobre pastagem nativa, após 5 anos de cultivo, Santa Maria, RS. 25

FIGURA 4 - Dendogramas resultantes da análise de agrupamento, para macrofauna euedáfica, em solo calcariado em sistema de plantio direto sobre pastagem nativa, após 5 anos de cultivo, utilizando o método de Joining (Tree Clustering), baseado em $1 - Pearson - r$, Santa Maria, RS. 25

CAPITULO II

FIGURA 1 - Colônias de bactérias nitrificadoras desenvolvidas em placas de sílica-gel com solo disperso. A=testemunha, zero de aplicação de calcário B=100% de calcário aplicado em superfície. 37

FIGURA 2 - Número de bactérias nitrificadoras por grama de solo em relação ao pH. Tratamentos: A) testemunha (sem calcário); B) quantidade recomendada pelo método SMP para pH 6 (100%), incorporada ao solo nas profundidade de 20cm; C) quantidade recomendada pelo método SMP para pH 6 (100%), distribuída na superfície do solo; D) metade da quantidade recomendada pelo método SMP para pH 6 (50%), distribuída do solo;

E) um quarto da quantidade recomendada pelo método SMP para pH 6 (25%), distribuída na superfície do solo..... 39

FIGURA 3 - Número de bactérias nitrificadoras por grama de solo em relação à profundidade de coleta do solo. Tratamentos: A) testemunha (sem calcário); B) quantidade recomendada pelo método SMP para pH 6 (100%), incorporada ao solo nas profundidade de 20cm; C) quantidade recomendada pelo método SMP para pH 6 (100%), distribuída na superfície do solo; D) metade da quantidade recomendada pelo método SMP para pH 6 (50%), distribuída do solo; E) um quarto da quantidade recomendada pelo método SMP para pH 6 (25%), distribuída na superfície do solo. 41

FIGURA 4 - Número de bactérias nitrificadoras por grama de solo, teores de pH, alumínio (AL), cálcio (Ca), magnésio (mg) nos tratamentos: A) testemunha (sem calcário); B) quantidade recomendada pelo método SMP para pH 6 (100%), incorporada ao solo nas profundidade de 20cm; C) quantidade recomendada pelo método SMP para pH 6 (100%), distribuída na superfície do solo; D) metade da quantidade recomendada pelo método SMP para pH 6 (50%), distribuída do solo; E) um quarto da quantidade recomendada pelo método SMP para pH 6 (25%), distribuída na superfície do solo. 43

CAPITULO III

FIGURA 1- Seqüência do preparo das oligoquetas , fixação do organismo (A) e material pronto para extração de DNA 52

FIGURA 2 - DNA genoma de *Eisenia foetida* (A1,A2) e *Pheretima* sp. (B1,B2), Marcador molecular Gibco 1 Kb 54

CAPITULO I - INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO DE CALCÁRIO NA POPULAÇÃO DE ARTHROPODA E OLIGOCHAETA EM SOLO SOB PLANTIO DIRETO

1.1 Introdução

O solo é um sistema complexo composto de seres vivos, ar, água, matéria orgânica e minerais que interagem. Neste sentido os organismos do solo, além de habitantes, são parte integrante de sua composição. No solo, a atividade agrícola que geralmente inicia em área natural, com muitas espécies de plantas e animais convivendo em equilíbrio, pode passar para uma redução da biodiversidade, decorrente das práticas culturais. Vários trabalhos destacam o efeito das práticas agrícolas sobre a fauna do solo (WARDLE et al., 1995; LAVELLE & PASHANASI, 1989; AL-ASSIUTY et al., 1993; MAFRA et al., 2002). De acordo com o tipo de prática, e do tipo de impacto causado, as reações dos diferentes grupos de organismos podem ser negativas, positivas ou neutras.

O estudo da fauna do solo é relativamente recente, e abrange os organismos constituintes do solo e suas atividades nos processos pedológicos. No Brasil, atualmente já existem trabalhos destacando o efeito das práticas agrícolas sobre a biota do solo, (SILVA MOÇO et al., 2002; LIMA et al., 2002; TOLEDO et al., 2002; MANFROI et al., 2002; SILVA et al., 2002; TERRA et al., 2002). Em alguns casos, não há modificação do tamanho da população, podendo, entretanto haver mudança na sua estrutura. Dessa maneira, a redução da diversidade de espécies e a modificação da estrutura das populações constituintes da fauna edáfica podem representar um indicador do efeito de práticas agrícolas ao longo do tempo, principalmente no sistema de plantio direto.

Como o sistema de plantio direto é baseado no princípio de não revolvimento do solo, a aplicação de calcário ao solo neste sistema precisou ser modificada, devendo o calcário ser distribuído na superfície do solo sem ser incorporado. A forma de aplicação e a quantidade de calcário recomendada para lavouras sob preparo convencional deveriam ser reavaliadas e revistas tanto para plantio direto como convencional (SÁ, 1993). Trabalhos recentes (CAIRES

et al., 2000; CAIRES & FONSECA, 2000; SÁ, 1993; OLIVEIRA & PAVAN, 1996; PÖTTKER et al., 1998) têm indicado que a necessidade de calcário no sistema de plantio direto talvez seja menor do que no sistema de preparo convencional. Segundo Anghinoni & Salet (2000), as recomendações de calagem no RS/ SC foram elaboradas dentro de técnicas convencionais de preparo e cultivo do solo. O manejo da calagem neste sistema é facilitado pela mobilização do solo antes do cultivo. Estes autores citam que devido às alterações que ocorrem no solo submetido ao sistema plantio direto, as recomendações de calagem devem sofrer ajustes e/ou alterações. Questionamentos surgem por ocasião da reaplicação do calcário no sistema de plantio direto já estabelecido, relacionados com a definição da dose a aplicar e a forma de reaplicar, uma vez que o sistema pressupõe a não mobilização do solo. Como tais doses e modo de aplicação do calcário em plantio direto influenciam a fauna do solo ainda não são suficientemente conhecidos os efeitos dessas doses e modalidades de aplicação sobre a fauna do solo.

Em solos sob vegetação natural, os recursos biológicos resultam de processos de adaptação às condições ambientais, refletindo os mecanismos de evolução do ecossistema como um todo. Com as modificações impostas pelo uso do solo, e em particular pela agricultura, a fauna e os micrororganismos, em diferentes graus de intensidade, são afetados pelos impactos provocados pelas práticas agrícolas (ALVAREZ et al., 2001; ANDREN et al., 1988), tanto devido às modificações nas propriedades do solo, como pela ação direta dessas práticas sobre os organismos.

O estudo das relações entre diversidade e funcionamento é particularmente importante no solo, por ser um local constituído por habitat altamente diversos. A importância destas relações reside na possibilidade de se prever mudanças no funcionamento dos sistemas, em decorrência de alterações na sua diversidade (TILMAN, 1996).

A diversidade ecológica ou a variedade e abundância das espécies em diferentes habitats, é um dos temas centrais da ecologia, nos últimos anos (MAGURRAN, 1988). Embora trabalhos em ecologia, sistemática e conservação biológica incluam discussões sobre biodiversidade, há controvérsias sobre suas várias definições (LUBCHENCO et al., 1991). Atualmente segundo Val (2000), a mais utilizada definição para o termo Biodiversidade é aquela estabelecida no âmbito da Comissão de Ciência e Tecnologia do Congresso dos Estados Unidos da América (OTA - Office of Technology Assessment) em 1987: "Biodiversidade abrange a variedade e a variabilidade entre os organismos vivos e os complexos ecológicos nos quais eles ocorrem. Diversidade pode ser definida como o número de itens diferentes e sua freqüência relativa. Por diversidade biológica, esses itens são

organizados em muitos níveis, variando de ecossistemas completos a estruturas químicas que são a base molecular da hereditariedade. Assim, o termo engloba diferentes ecossistemas, espécies, genes e sua abundância relativa". Esta definição abrange os conceitos de quantificação de espécies existentes num ecossistema (abundância e riqueza) bem como suas relações com o meio ambiente, suas diversas populações em seus diversos *habitats*.

O estudo das relações entre diversidade e funcionamento é particularmente importante no solo, por ser um local constituído por habitats altamente diversos. A importância destas relações reside, na possibilidade de se prever mudanças no funcionamento dos sistemas, em decorrência de alterações na sua diversidade (TILMAN, 1996).

Sendo a biodiversidade vista como uma medida de qualidade ambiental, é comum que, para sua avaliação, se utilizem diferentes aproximações, métodos e medidas (DUELLI, 1997).

Odum (1988) considerou que a diversidade de espécies pode ser expressa com base em duas abordagens. A primeira emprega curvas de abundância relativa do componente dominância da diversidade (WHITTAKER, 1965) e a segunda utiliza índices de diversidade constituídos por proporções ou outras expressões matemáticas das relações de importância das espécies.

Os índices de diversidade são expressos por um único número, que pode representar a redução ou a abundância de um conjunto complexo de táxons. Segundo Mahafee & Kloepper (1997), o fato de se utilizar um único número para representar uma determinada situação é vantajoso, pois facilita a comparação em experimentação, assim como possibilita a verificação de mudanças que ocorrem nas comunidades relacionadas. Kennedy & Smith (1995) consideraram que os índices, embora não representem a composição total de uma comunidade, permitem dimensionar a riqueza, a igualdade e a diversidade nos diferentes ambientes estudados. Os índices são usados como descritores da diversidade há muito tempo, havendo, um grande número de descritores, que avalia a diversidade sob diferentes aspectos, tais como: similaridade (dados qualitativos e quantitativos), diversidade específica, diversidade de dominância e de riqueza aparente, como também de equitatividade e dominância (ROSSO, 1996).

Os impactos antrópicos que reduzam o número de espécies ou a abundância relativa das mesmas, serão refletidos em decréscimos nos índices de diversidade (WALKER, 1989).

O índice Shannon-Wiener, já tradicionalmente designado como índice de Shannon (H), é a medida de diversidade mais consagrada (ROSSO, 1996). Para Wihlm (1972), esta equação é a mais satisfatória dentre as desenvolvidas para diversidade específica e de dominância, pois expressa a importância relativa de cada espécie e não apenas a proporção entre espécies e

indivíduos, assumindo, que os indivíduos são amostrados ao acaso de uma população indefinidamente grande e que todas as espécies estão representadas na amostra coletada, sendo relativamente independente do tamanho da amostra. Os dados obtidos se enquadram numa distribuição normal, desde que N seja um número inteiro, então métodos estatísticos podem ser empregados para testar a significância das diferenças entre as médias. Este índice mesmo sendo apenas um estimador, é bastante usado em estudos de biota dos solos. Odum (1988) cita que este é o índice que atribui um maior peso a espécies raras.

Este trabalho visou avaliar e caracterizar a composição faunística em solo calcariado há 5 anos em um sistema de plantio direto sobre campo nativo, com diferentes doses e modos de aplicação de calcário.

1.2 Material e Métodos

A avaliação da população faunística do solo foi realizada em experimento estabelecido há cinco anos, com doses e modos de aplicação de calcário sob sistema de plantio direto em campo nativo, na área experimental do Departamento de Solos da UFSM. O solo é classificado como Argissolo Vermelho Distrófico Arênico (EMBRAPA, 1999) com declividade de 2-5%. Os tratamentos foram: A) testemunha (sem calcário); B) quantidade recomendada pelo método SMP para pH 6,0 (100%), incorporada ao solo na profundidade de 20 cm; C) quantidade recomendada pelo método SMP para pH 6,0 (100%), distribuída na superfície do solo; D) metade da quantidade recomendada pelo método SMP para pH 6,0 (50%), distribuída na superfície do solo; E) um quarto da quantidade recomendada pelo método SMP para pH 6,0 (25%), distribuída na superfície do solo. A dose recomendada foi $6,8 \text{ t ha}^{-1}$ (PRNT 100%). Os tratamentos tiveram quatro repetições em blocos ao acaso, com parcelas medindo 5 x 10 m. A adubação das culturas foi conforme recomendação da ROLAS (COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO, 1993). A área foi mantida com a seguinte rotação de culturas: aveia/soja; aveia/milho; aveia/soja; ervilha/milho; aveia/soja.

Para avaliação da população da meso e macrofauna do solo no experimento descrito acima, foram coletadas amostras em julho (inverno) e dezembro (verão) de 2001. Para levantamento de meso e macro organismos epiedáficos foram instaladas armadilhas de captura, e para macrorganismos euedáficos foram coletados monólitos de solos.

A coleta da fauna epiedáfica foi realizada utilizando o método de captura Provid (SILVA et al., 2001), o qual se adapta à coleta de organismos com maior mobilidade. Foram

instaladas duas armadilhas por parcela, perfazendo um total de oito repetições por tratamento. As armadilhas permaneceram instaladas no campo por 4 dias.

Para determinação da macrofauna euedáfica, foram escolhidos aleatoriamente dois pontos por parcela. As coletas das amostras de solo foram segundo método descrito por Norris & Conroy (1999), a profundidade de 0-20 cm. As amostras coletadas individualmente foram colocadas em sacos de polietileno, acondicionadas em caixas de isopor e levadas ao Laboratório de Biologia do Solo do Departamento de Solos da UFSM. Posteriormente, foram realizadas a separação, contagem e classificação de grupos taxonômicos em nível de classe e ordem dos organismos, realizada manualmente em microscópio estereoscópio, segundo metodologia descrita por Frampton (2001).

Os dados relativos ao número de indivíduos foram obtidos a partir da média dos tratamentos, e para macrofauna, estimados por metro quadrado. As frequências de organismos foram calculadas pelas percentagens de ocorrência de grupos taxonômicos na área experimental e foram utilizadas para a classificação dos grupos em constantes e acessórios, segundo classificação adotada por Terra et al.(2002). Constantes são considerados os grupos com que ocorreram em mais de 50% das amostras e acessórios foram considerados os grupos que ocorreram em menos de 50% das amostras. Os grupos em estudo foram classificados como dominantes quando representam 5% ou mais da comunidade e influentes aqueles cuja representatividade variou de 2 a 5% do total de indivíduos na comunidade (ADAMS, 1971).

Os índices de diversidade de Shannon (H'), foram calculados segundo metodologia descrita por Walker (1989). Para comparação das médias entre doses e modos de aplicação de calcário foi aplicado o teste Tukey a 5%. Para classificação da macrofauna foi realizada análise de agrupamento, segundo Statistica for Windows Release 4.5 (1993).

Solbrig (1991) resumiu em uma definição clara e concisa que biodiversidade é a inter-relação de três elementos: diversidade genética, funcional e taxonômica. Abundância de organismos é considerado o somatório dos indivíduos de todos os grupos em estudo. Riqueza de espécies é o número de ordens ou classes de organismos presentes nas amostras estudadas. A diversidade expressa através de índices é medida através da variedade e abundância de espécies em um ecossistema.

1.3 Resultados e Discussão

Neste levantamento, da meso e macrofauna epiedáfica, utilizando armadilhas de captura, considerando as duas épocas de coleta, ocorreram 17 grupos taxonômicos (Tabelas 1 e 2), com ocorrência de 5 classes: Arachnida, Diplopoda, Crustácea, Oligochaeta e Insecta, sendo esta representada por 12 ordens. Segundo Assad et al. (1995), como é difícil qualificar uma comunidade na íntegra, o que tem sido feito é analisar parcelas desta comunidade, escolhendo determinados grupos taxonômicos, associados a frações do habitat que tenham uma função semelhante no ecossistema.

A sensibilidade dos organismos de solo aos diferentes manejos, pode refletir o efeito de uma determinada prática de manejo do ponto de vista da estrutura e fertilidade do solo, ou condições climáticas. Tais características justificam a utilização da fauna de solo como indicadora das modificações do ambiente (ASSAD et al., 1995; LAVELLE & PASHANASI, 1989; BARETA et al., 2002).

No presente trabalho os organismos epiedáficos foram mais abundantes na coleta realizada no verão do que na realizada no inverno. Resultados semelhantes foram relatados por Manfroi et al. (2002) e Mafra et al. (2002). Resultados similares quanto à época de coleta foram encontrados também por Böck (2002), o qual cita que a variação provavelmente esteja relacionada às condições climáticas e microclimáticas ocorrentes nos períodos de coleta, visto que a fauna do solo é sensível a mudanças de umidade e temperatura, como também à disponibilidade de alimento. Silva Moço et al. (2002) observaram variações sazonais entre amostras coletadas no inverno e verão, citando que a maior variação não foi em riqueza de espécies; número de espécies existentes em um lugar ou em uma amostra biológica, mas em abundância, número absoluto de representantes de uma espécie.

As doses e modos de aplicação de calcário tiveram pouca influência sobre a abundância e riqueza da fauna epiedáfica, (Figura 1, Tabelas 1 e 2), embora a dose zero de calcário tenha sido a que apresentou menor abundância nas duas épocas de coleta. As diferenças entre abundância foram maiores entre épocas de coleta do que entre diferentes modos e doses de aplicação de calcário. A abundância de organismos apresenta-se com maior similaridade entre as diferentes doses e modos de aplicações de calcário na coleta realizada no inverno, entretanto a riqueza de grupos foi mais uniforme na coleta de verão (Figura 1).

Um menor número de representantes da meso e macro fauna epiedáfica dos grupos Collembola, Acarina, Coleóptera e Oligochaeta foi verificado na coleta de inverno do que na realizada no verão (Tabelas 1 e 2). Silva Moço et al. (2002) relatam que a média de indivíduos

decaiu no mês de junho, já na coleta realizada pelos pesquisadores no verão, houve um aumento nas médias, principalmente no número de colembolos.

As ordens Dermaptera e Protura não apresentaram nenhum representante na coleta de julho, já na coleta de dezembro não ocorreram representantes da ordem Homóptera, devendo-se ressaltar que na coleta de julho, o número de organismos desta ordem foi bastante baixo, embora presente em quase todos os tratamentos.

Nas Tabelas 1 e 2, observa-se que os grupos classificados como constantes (frequência igual ou superior a 50%) considerando-se as duas épocas de coleta foram os grupos taxonômicos Acarina, Aracnidea, Coleóptera, Collembola, Díptera, Isoptera, Orthoptera, Diplopoda e Oligochaeta. Tendo sido classificados como acessórios (frequência entre 25 e 50%), os grupos Hemíptera, e Tysanoptera, nas duas épocas de coleta. É importante ressaltar que alguns grupos, embora classificados como constantes, apresentam uma abundância bastante baixa.

A contribuição de cada grupo na composição da comunidade edáfica, nos diferentes tratamentos, foi calculada pela percentagem do número de organismos de cada grupo no total de organismos da comunidade (Tabelas 1 e 2). Na coleta realizada no inverno os grupos Collembola e Díptera foram os que contribuíram com maior percentagem de ocorrência nas amostras em todos os modos e doses de aplicação de calcário estudados. Na coleta realizada no verão, a ordem Collembola manteve uma percentagem de ocorrência alta. Segundo Heisler (1989) os Oribatei (Acari: Cryptostgmsata) e os colembola (Insecta) são os dois grupos mais abundantes em espécies e indivíduos da fauna edáfica. Singh & Pillai (1975) afirmaram que eles constituem de 72% a 97% dos indivíduos da fauna total de artrópodes do solo. A seguinte contribuição em percentagem de organismos foi Acarina e houve uma queda acentuada nas percentagens de ocorrência para Díptera e Aracnídea, tendências verificadas em todas as análises efetuadas. Baretta et al. (2002) citam que a frequência relativa de dípteros foi mais alta nas áreas sob plantio direto, do que em sistema convencional.

Os grupos em estudo também foram divididos em dominantes e influentes. Nas Tabelas 1 e 2, verificam-se índices de dominância para o grupo Collembola nas duas épocas de coleta, registrando-se índices mais elevados na coleta realizada no verão. Embora constantes, alguns grupos não são classificados como dominantes, a exemplo do grupo Díptera na coleta realizada no verão, e os grupos Isoptera e Orthoptera nas duas épocas de coleta. As diferentes formas e doses de aplicação de calcário, não apresentaram diferenças expressivas na ocorrência de grupos dominantes ou influentes, Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Diversidade e frequência da fauna epiedáfica em solo calcariado em sistema de plantio direto com 5 anos de cultivo, coleta inverno 2001, Santa Maria, RS.

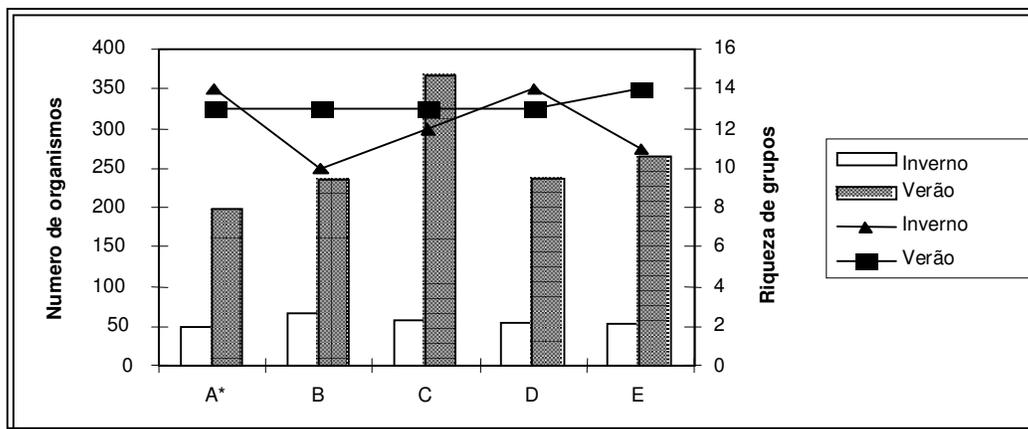
Grupos	A*		B		C		D		E		F %
	N**	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
Acarina	3	1,08	15	5,34	4	1,44	4	1,17	6	1,99	100 c
Aracnidea	5	1,9	5	1,72	5	1,80	5	1,72	7	2,44	100 c
Coleoptera	3	0,99	1	0,32	4	1,35	3	1,08	3	0,90	100 c
Collembola	8	2,7	20	7,15	13	4,71	19	6,88	13	4,80	100 c
Díptera	19	6,70	16	5,6	17	6,25	11	3,89	12	4,25	100 c
Dermaptera											
Hemíptera	1	0,18					1	0,9			40 a
Homóptera	1	0,9			1	0,9	1	0,45	1	0,63	80 c
Isoptera	1	2,7	1	0,27	2	0,63	2	0,72	2	0,72	100 c
Lepidóptera	1	0,9			2	0,54	1	0,63	1	0,32	80 c
Odonata					1	0,63					40 a
Orthoptera	3	0,99	2	0,54	2	0,63	3	1,17	3	0,99	100 c
Protura											
Thysanoptera	2	0,81	2	0,27							40 a
Crustáceos	1	0,18					1	0,9			40 a
Diplopoda	3	0,90	4	1,26	5	1,63	2	0,72	2	0,81	100 c
Oligoqueta	2	0,81	4	1,35	5	1,72	2	0,72	2	0,81	100 c
Total %		17,66		23,91		21,10		19,11		18,38	
Dominantes		1		3		1		1		0	
Influentes		2		0		1		1		3	
Índice Shannon (H)		2,14		1,80		2,09		2,10		2,03	

A* = 0% calcário; B = 100% incorporado; C = 100% superfície; D = 50% superfície; E = 25% superfície; F = presença de organismos nos sistemas; N ** = Número médio de organismos por tratamento; % = % de ocorrência nos tratamentos. c , a = constantes, acessórios.

Tabela 2 - Diversidade e freqüência da fauna epiedáfica em solo calcariado em sistema de plantio direto com 5 anos de cultivo, coleta verão, Santa Maria, RS, 2001.

Grupos	A*		B		C		D		E		F %
	N**	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
Acarina	64	4,9	70	5,36	89	6,80	68	5,22	99	7,62	100 c
Aracnidea	3	0,23	5	0,34	5	0,38	4	0,26	4	0,26	100 c
Coleóptera	6	0,44	12	0,88	5	0,40	12	0,82	6	0,46	100 c
Collembola	109	8,41	119	9,16	251	19,31	134	10,31	139	10,72	100 c
Dermaptera	1	0,01	1	0,03			1	0,01	1	0,03	100 c
Díptera	2	0,11	1	0,05	1	0,05	1	0,05	1	0,05	100 c
Hemíptera							1	0,03	1	0,01	40 a
Homóptera											
Isoptera	1	0,10	1	0,09	6	0,44	3	0,01	2	0,11	100 c
Lepidóptera					1	0,01			1	0,01	40 a
Odonata	1	0,05	1	0,05	1	0,03			1	0,05	80 c
Orthoptera	3	0,24	5	0,40	3	0,24	6	0,44	2	0,01	100 a
Protura			1	0,03			1	0,01			40 a
Thysanoptera	1	0,01			1	0,03					40 a
Crustáceos	1	0,05	1	0,09	1	0,07	1	0,03	1	0,01	100 c
Diplopoda	4	0,28	12	0,88	2	0,11	4	0,32	4	0,26	100 c
Oligoqueta	3	0,24	9	0,69	3	0,19	7	0,49		0,46	100 c
Total %		15,14		18,06		28,13		18,27		20,31	
Dominantes		1		2		2		2		2	
Influentes		1		0		0		0		0	
Índice de Shannon (H)		1,22		1,40		0,95		1,28		1,16	

A* = 0% calcário; B = 100% incorporado; C = 100% superfície; D = 50% superfície; E = 25% superfície;
 F = presença de organismos nos sistemas; N** = Número médio de organismos por tratamento; % = % do total de indivíduos. . c , a = constantes, acessórios.



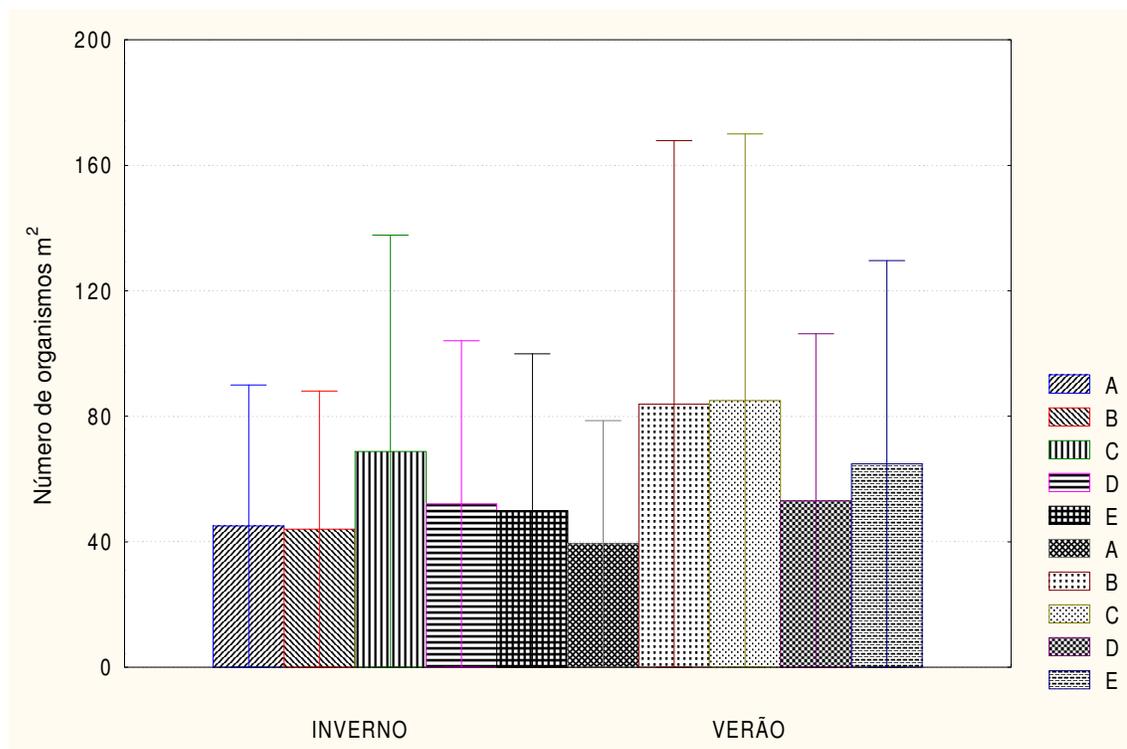
*A = 0% calcário; B = 100% incorporado; C = 100% superfície; D = 50% superfície; E = 25% superfície. Linhas representam riqueza de grupos, colunas representam abundância (número de organismos).

Figura 1 - Abundância e riqueza de grupos taxonômicos de organismos epiedáfcos em solo calcariado em sistema de plantio direto após 5 anos de cultivo, Santa Maria, RS.

As determinações da uniformidade do número de indivíduos de cada espécie; presentes num ecossistema são chamadas de Índices de Diversidade, nestes índices, quanto maior a equidade dos números de indivíduos das várias espécies encontradas, maior é a diversidade. A população da fauna do solo expressada através do índice de diversidade de Shannon (H), (Tabelas 1 e 2) mostra que na coleta de inverno os índices foram maiores do que na coleta de verão, sendo esta diferença mais acentuada que a diferença entre as áreas analisadas com as diferentes doses e modos de aplicação de calcário. Isto sugere uma maior interferência das condições climáticas sobre os organismos do que a própria ação do calcário. Corrêa Neto et al. (2001), em trabalho sobre mesofauna edáfica em florestas, encontraram as maiores variações no índice de Shannon (H) variando de 0,87 a 1,6, entre estações do ano do que entre os diferentes tipos de cobertura vegetal.

Para macrorganismos euedáfcos, observa-se na coleta realizada no inverno, maior abundância de organismos da macrofauna euedáfica na aplicação de 100% da dose recomendada de calcário em superfície. Já na coleta realizada no verão, estes organismos foram mais abundantes quando da aplicação de 100% da dose de calcário incorporado. Entretanto, conforme se pode observar na Figura 2, não ocorreram diferenças estatisticamente significativas na abundância de organismos da macrofauna edáfica entre os tratamentos, utilizando diferentes dosagens e modos de aplicação de calcário. Mafra et al. (2002), analisando um experimento no Paraná com 14 anos de duração, com vários sistemas de

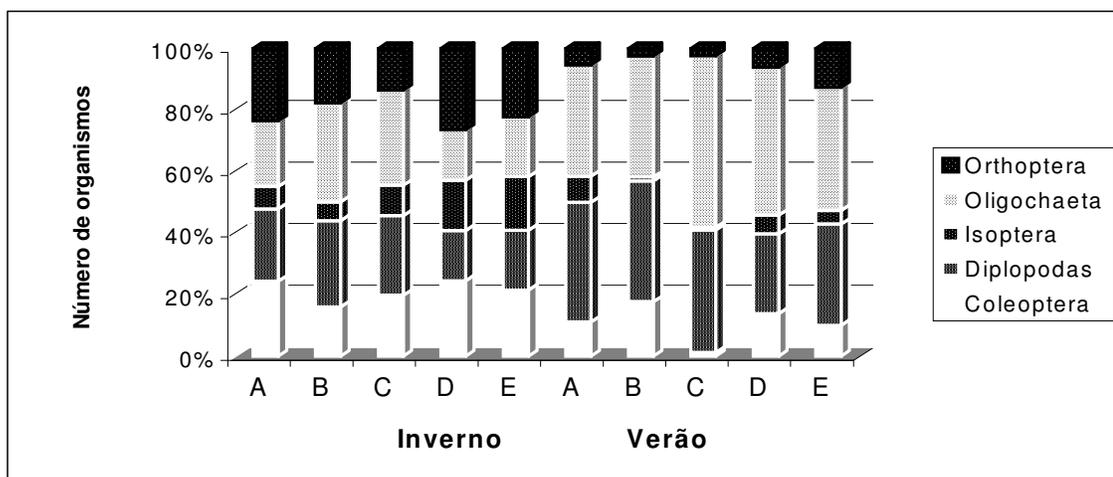
cultivo e aplicação de calcário em superfície e incorporado, citam que os diferentes métodos de aplicação de calcário não interferiram na abundância dos invertebrados edáficos.



*A = 0% calcário; B = 100% incorporado; C = 100% superfície; D = 50% superfície; E = 25% superfície.

Figura 2 - Abundância de grupos taxonômicos de organismos euedáficos, em solo calcariado em sistema de plantio direto após 5 anos de cultivo, Santa Maria, RS.

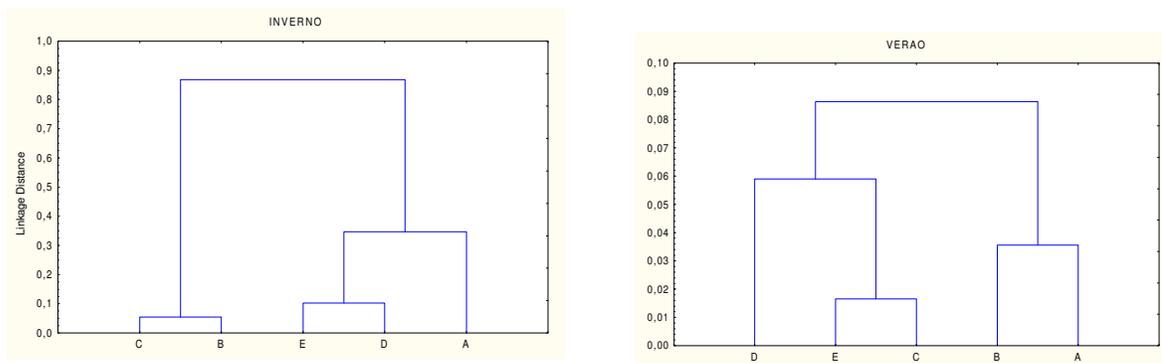
Embora sem uma variação significativa entre número de organismos nos diferentes modos e doses de aplicação de calcário, observa-se na Figura 3, uma redução nos grupos Coleóptera, Isoptera e Orthoptera na coleta realizada no verão, sendo os grupos Diplopodos e Oligochaetas, os de maior expressão nesta época de coleta.



*A = 0% calcário; B = 100% incorporado; C = 100% superfície; D = 50% superfície; E = 25% superfície.

Figura 3 - Grupos de organismos da macrofauna nos diferentes doses e modos de aplicação de calcário em sistema de plantio direto após 5 anos de cultivo, Santa Maria, RS.

Na análise de agrupamentos para macrofauna edáfica em solo calcariado em sistema de plantio direto (Figura 4), observa-se a formação de grupos em dois níveis, tanto para coleta de inverno como para de verão. Na coleta de inverno no primeiro nível, encontram-se a aplicação de calcário de 100% incorporado e 100% na superfície, com distancia inferior a 20%. No segundo nível, encontram-se a aplicação de 100%, 50% e 25% de calcário aplicado na superfície, com distancia inferior a 60%.



*A = 0% calcário; B = 100% incorporado; C = 100% superfície; D = 50% superfície; E = 25% superfície.

Figura 4 - Dendrogramas resultantes da análise de agrupamento, para macrofauna euedáfica, em solo calcariado em sistema de plantio direto após 5 anos de cultivo, utilizando o método de Joining (Tree Clustering), baseado em $1 - \text{Pearson} - r$., Santa Maria, RS.

1.4 Conclusões

A abundância e riqueza da fauna edáfica verificada não foram afetadas pelas doses e modo de aplicação de calcário em sistema de plantio direto.

A população de organismos mais representativa da mesofauna foi de collembola.

As épocas de coleta (verão-inverno) determinaram maiores diferenças que as dos tratamentos com modos e aplicação de calcário tanto em abundância como em diversidade de organismos da fauna edáfica.

1.5 Referências bibliográficas

ADAMS, E.C.G. Ecological studies of microarthropods in New Zealand pasture soil with special reference to the collembol. **Pedobiologia** 11:321-327, 1971.

ANDREN, O.; PAUSTIAN, K. & ROSSWALL, T. Soil biotic interactions in the functioning of agroecosystems. **Agric. Ecosyst. Environ.** 24, 57-67, 1988.

AL-ASSIUTY, A.L.; BAYOUMI, B.M.; KHALIL, M.A. & VAN STRAALLEN, N.M. The influence of vegetational type on seasonal abundance and species composition of soil fauna at different localities in Egypt. **Pedobiologia**, 37, 210-222, 1993.

ALVAREZ, T., FRAMPTON, G.K. and GOULSON, D. Epigeic Collembola in winter wheat under organic, integrated and conventional farm management regimes. **Agriculture Ecosystems Environment**. 83, 95-110. 2001

ANGHINONI, I. & SALET, R.L. Reaplicação de calcário no sistema plantio direto consolidado. In: KAMINSKI, J. Coord. **Uso de corretivos da acidez do solo no plantio direto**. Pelotas: SBCS-Núcleo Regional Sul 2000, 123p. (SBCS-Núcleo Regional Sul. Boletim Técnico, 4).

ASSAD, M.L.L. & LACERDA, R.C.A. Caracterização de termiteiros em área de pastagem do Distrito Federal. In: Congresso Brasileiro de Ciência do Solo (25: 1995: Viçosa, MG) **Resumos Expandidos** - Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo; Universidade Federal de Viçosa, 1995. p. 445-447.

BARETTA, D.; SANTOS, J. C. P.; WILDNER, L. P. & MIQUELLUTI, D. J. Mesofauna edáfica em diferentes sistemas de manejo do solo. In: **Anais ... Fertbio. 2002. Resumos expandidos. Fertbio 2002**. Rio de Janeiro: EMBRAPA e UFRRJ (2002) CD-ROM.

BÖCK, V. D.; ELTZ, F. L. F & SANTOS, M. V. C. Diversidade populacional de artrópodes em solo sob diferentes sistemas de manejo na cultura de melancia, Santa Maria/RS. In: **Anais ... XIV Reunião Brasileira de Manejo do Solo e da Água. 2002 Cuiabá, MT, UFMT/CNPS/SBCS. CD-ROM.**

CAIRES, E.F. & FONSECA, A. F. Absorção de nutrientes pela soja cultivada no sistema de plantio direto em função da calagem na superfície. **Bragantia**, Campinas, 59 (2): 213-220, 2000.

CAIRES, E.F.; BANZATTO, D.A.& FONSECA, A.F. Calagem na superfície em sistema de plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 24:161-169, 2000.

COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO. **Recomendação de adubação e de calagem para os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 2 ed. Lages : SBCS-NRS. 1993.

CORRÊA NETO, T.A.; PEREIRA, M.G.; CORREA, M.E.F.& ANJOS, L.H.C. Deposição de serrapilheira e mesofauna edáfica em áreas de eucalipto e floresta secundária. **Floresta e Ambiente**. V. 8, n.1, p.70 – 75. 2001

DUELLI, P. Biodiversity evaluation in agricultural landscapes: an approach at two different scales. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.62, p.81-91, 1997.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Sistema brasileiro de classificação de solo. Brasília, **Embrapa produção de informações**; Rio de Janeiro, 1999. 412p.

FRAMPTON, G. K. , Diel activity patterns in an arable collembola community . **Applied Soil Ecology** - v. 17, n.1, May 2001, p. 63-80.

HEISLER, C. Erfassung der Collembolen und Milbenfauna einer Ackerfläcker. **Zoologischer Anzeiger**, v. 223, n. 3/4, p.239-248, 1989.

KENNEDY, A.C.; SMITH, K.L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. **Plant and Soil**, v.170, p.75-86, 1995.

LAVELLE, P. & PASHANASI, B. Soil macrofauna and land management in Peruvian amazonia (Yurimaguas, Loreto). **Pedobiologia**, Jena, 33, 283-29,1989.

LIMA, D. A. de; CORREIA M. E. F.; SANTOS, H. P.; AQUINO, A. M.; MANTO, L. & FONTANELI, R. S. Influência de diferentes sistemas de preparo de solo e rotações de culturas sobre a macrofauna do solo em Passo Fundo, Rio Grande do Sul. In: **Anais ... Fertbio 2002**. Resumos expandidos. Fertbio 2002. Rio de Janeiro: EMBRAPA e UFRRJ (2002) CD-ROM.

LUBCHENCO, J.; OLSON, A.M.; BRUBAKER, L.R.; CARPENTER, S.R.;...The sustainable biosphere initiative: an ecological research agenda. **Ecology**, v.72, p.371-412, 1991.

MAFRA, A. L.; ALBUQUERQUE, J. A.; MEDEIROS, J. C.; DALLA ROSA, J.; FONTOURA, S. M. V. & BAYER, C. Manejo do Solo e Fauna Edáfica em Experimento de Longa Duração na Região de Guarapuava, PR. In: **Anais ... XIV Reunião Brasileira do Solo e da Água**. 2002 Cuiabá, MT, UFMT/CNPS/SBCS. CD-ROM.

MAGURRAN, A.E. **Ecological diversity and its measurement**. MAGURRAN, A.E., eds. 1988, 177 p.

MAHAFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Temporal changes in the bacterial communities of soil, rhizosphere, and endorhiza associated with field-grown cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Microbial Ecology**, v.34, p.210-223, 1997.

MANFROI, A. F.; SANTOS, J. C. P.; MENDONÇA, D.; MAFRA, Á. L.; CRESTANI, F. & SCHROEDER, J. Diversidade da fauna edáfica como bioindicador da recuperação de solo reconstruído após mineração de carvão a céu aberto. In: **Anais ... Fertbio 2002**. Resumos expandidos. Fertbio 2002. Rio de Janeiro: EMBRAPA e UFRRJ (2002) CD-ROM.

NORRIS, P. & CONROY, C. **Fire ecology of soil and leaf litter invertebrates**. CONFERENCE PROCEEDINGS. Australian Bushfire Conference, Albury, July 1999

ODUM, E.P. Populações em comunidades. In: ODUM, E.P., eds, **Ecologia**. São Paulo: Guanabara, 1988. p.258-272.

OLIVEIRA, E.L. DE & PAVAN, M.A. Control of soil acidity in no-tillage system for soybean production. **Soil & Tillage Research**, Amsterdam, v. 38, n1/2, p. 47-57. 1996.

PÖTTKER, D.; AMBROSI, I.; BEM, J.R.; KOCHHANN, R.A. & DENARDIN, J.E. Calagem em plantio direto. Passo Fundo: EMBRAPA/CNPT/Projeto METAS, 1998. 40p. (Boletim técnico, 4).

ROSSO, S. Amostragem, repartição espacial e diversidade/dominância de comunidades de costões rochosos: uma abordagem metodológica. Laboratório de Ecologia Marinha/USP. 1996. 30 p.

SÁ, J.C. de. Manejo da fertilidade do solo no sistema plantio direto. In: **EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Trigo (Passo Fundo, RS). Plantio Direto no Brasil**. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT / FECOTRIGO – FUNDACEP / FUNDAÇÃO ABC / Editora Aldeia Norte, 1993, p. 37-60.

SILVA MOÇO, M.K.; GAMA-RODRIGUES, E. F. & CORREIA, M.E. F. Composição da fauna edáfica de diferentes ecossistemas florestais da região norte fluminense. In: **Anais ... Fertbio 2002. Resumos Expandidos. Fertbio 2002.** Rio de Janeiro: EMBRAPA e UFRRJ (2002) CD-ROM.

SILVA, D. M. ; CONCEIÇÃO, P. C.; BOCK, V.; SILVA R. F.& ANTONIOLLI, Z. I. Densidade populacional da fauna edáfica em diferentes áreas da Depressão Central do Estado do Rio Grande do Sul. In: **Anais ... XXVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 2001, Londrina, Paraná. Resumos.** Londrina, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo.

SILVA, R. F.; AQUINO, A. M.; MERCANTE, F. M. Efeitos de diferentes sistemas de manejo do solo sobre a estrutura populacional da macrofauna edáfica, em Mato Grosso do Sul. In: **Anais ... Fertbio 2002. Resumos expandidos. Fertbio 2002.** Rio de Janeiro: EMBRAPA e UFRRJ (2002) CD-ROM.

SINGH, J.; PILLAI,K.S. A study of Soil microarthropod communities in same fields. **Revue Ecologie du Sol**, v. 12, n 3, p. 579-590, 1975.

SOLBRIG, O.T. From genes to ecosystems: a research agenda for biodiversity. **Report of a IUBS-SCOPE-UNESCO workshop.** The Internacional Union of Biological Science, Paris, 1991.

STATISTICA FOR WINDOWS RELEASE 4.5 STATSOFT - INC, 1993. Usou-se: **Cluster Analysis, Joining (Tree Clustering).** 1-PEARSONr. Single Linkage.

TERRA, G.; SILVA, A. N.; TOLEDO, L.O.; PEREIRA, M. G.; JORGE, A. C. Composição e diversidade da fauna edáfica de uma floresta secundária de altitude no município de Miguel Pereira –RJ. In: **Anais ... Fertbio 2002. Resumos expandidos. Fertbio 2002.** Rio de Janeiro: EMBRAPA e UFRRJ (2002) CD-ROM.

TILMAN, D. Biodiversity: population versus ecosystem stability. **Ecology**, v.77, p.350-363, 1996.

TOLEDO, L. O.; SILVA, A. N.; TERRA, G.; PEREIRA, M. G.; MENEZES, C. E. G. Caracterização da mesofauna edáfica de duas áreas de floresta secundária no município de Pinheiral (RJ). In: **Anais ... Fertbio 2002. Resumos expandidos. Fertbio 2002.** Rio de Janeiro: EMBRAPA e UFRRJ (2002) CD-ROM.

VAL, V. A. Amazônia: Interesses e conflitos. Atualizado em nov.2000 Disponível em: <<http://www.comciencia.br/reportagens/amazonia/amaz3.htm>> Acesso em: 22 nov.2004.

WALKER, D. Diversity and stability. In: **Ecological Concepts**. Ed: J.M.Cherrett. Blackwell Scientific Publ., Oxford, p.115-146, 1989.

WARDLE, D.A.; YEATS, G.M.; WATSON, R.N.; NICHOLSON, K.S. The detritus food-web and diversity of soil fauna as indicators of disturbance regimes in agro-ecosystems. **Plant and Soil**, v. 170, p.35-43, 1995.

WHITTAKER, R.H. Dominance and diversity in land plant communities. **Science**, v.147, .3655, p.250-260, 1965.

WILHM, J. Graphic and mathematical analyses of biotic communities in polluted streams. **Annual.Review of Entomology**, v.17, p.223-252, 1972.

CAPITULO II . INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO E QUANTIDADE DE CALCÁRIO NA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS NITRIFICADORAS

2.1 Introdução

O uso de calcário foi intensamente difundido e recomendado para melhorar a produtividade de lavouras, a partir da década de 60. A calagem é uma prática agrícola recomendada para adicionar cálcio e magnésio e elevar o pH do solo, com isso, liberando nutrientes e diminuindo a atividade do alumínio e manganês tóxicos. A aplicação de calcário normalmente segue a recomendação do manual de adubação e calagem (COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO – RS/SC, 2003).

O solo constitui um meio ou substrato no qual vivem microrganismos responsáveis por uma série de processos químicos, físicos e biológicos relacionados com a fertilidade do mesmo. A composição quantitativa da população microbiana do solo e sua natureza dependem da origem e da natureza da composição do solo, de seus constituintes minerais e orgânicos, e do uso e manejo deste. (ALEXANDER, 1977; DOMMERGUES & MANGENOT, 1970). O clima e o tipo de vegetação tem grande influência sobre a natureza e a abundância da microflora de um solo, ao lado das condições de umidade, aeração e reação do mesmo, sendo a composição relativa da população microbiana do solo ainda afetada pelo manejo deste, o que pode ser facilmente comprovado pela comparação das populações de um solo não cultivado com a de um idêntico cultivado, (BRUM,1975). Em condições naturais, os microrganismos se acham em um estado de equilíbrio, em que a abundância relativa dos vários grupos de bactérias, fungos e protozoários depende das condições naturais do solo. Em cultivo tal equilíbrio é freqüentemente perturbado e certos organismos multiplicam-se com grande intensidade em proporções muito superiores ao desenvolvimento de todos os grupos (LAL, 1998; COLEMAN & HENDRIX, 2000).

Sistemas de classificação bacteriana, baseados em atividades fisiológicas, tem sido usados em estudos em microbiologia do solo (VARGAS & HUNGRIA, 1997). As bactérias do solo incluem formas esporuladas e não esporuladas de bacilos, cocos, vibriões e espirilos, variando consideravelmente de tamanho e forma, de respiração aeróbia e anaeróbia e de nutrição heterotrófica e autotrófica (CARDOSO, 1992; ALEXANDER, 1977).

As bactérias autotróficas apresentam propriedades características; segundo Waksman (1952) desenvolvem-se na natureza em meio mineral, o qual contém substâncias inorgânicas, elementos ou compostos simples. Sua existência está relacionada com a presença de substâncias que sofrem oxidação, como uma consequência natural das suas próprias atividades vitais. A oxidação de substâncias minerais constitui a única fonte de energia para o seu desenvolvimento, não necessitando de nenhum nutriente orgânico para a construção do seu material celular. São sempre incapazes de decompor as substâncias orgânicas, e podem até ser detidas em seu crescimento pela presença de certos compostos orgânicos, utilizam exclusivamente o CO_2 como fonte de carbono, o qual é assimilado por quimiossíntese. Entre as bactérias autotróficas destacam-se as nitrificadoras e as sulfurosas (DOMMERGUES & MANGENOT, 1970; CARDOSO, 1992; VARGAS & HUNGRIA, 1997;).

Diversos tipos de bactérias nitrificadoras são encontradas nos solos, e foram classificadas por Winogradsky em 1890 em 2 grupos: 1) bactérias que oxidam sais de amônio produzindo nitritos: *Nitrosomonas*, *Nitrosocystis*, *Nitrosospira* e *Nitrosoglaea*; 2) bactérias que oxidam os nitritos a nitratos: *Nitrobacter*, *Nitroglae* e *Nitrocystis*.

As plantas, com exceção das leguminosas e de outras espécies vegetais que fixam o nitrogênio molecular (N_2) em simbiose com microorganismos, absorvem o nitrogênio mineral, principalmente nas formas nítrica (NO_3^-) e amoniacal (NH_4^+), enquanto no solo predomina a forma orgânica (RCOOHNH_2).

Quando os decompositores atuam sobre a matéria orgânica nitrogenada liberam diversos resíduos para o meio ambiente, entre eles a amônia (NH_3). Combinando-se com a água do solo, a amônia forma hidróxido de amônio que ionizando-se, produz NH_4^+ (íon amônio) e OH^- (hidroxila) (ALEXANDER, 1977; TISDALE & NELSON, 1970). Ao processo de decomposição, em que compostos orgânicos nitrogenados se transformam em amônia ou íon amônio, dá-se o nome de amonificação. Os íons amônio presentes no solo seguem algumas vias: são absorvidas pelas plantas, são perdidos por algum mecanismo bioquímico ou aproveitados por bactérias nitrificadoras do gênero *Nitrosomonas* e *Nitrosococcus*. Essas bactérias oxidam os íons e com a energia liberada, fabricam compostos orgânicos a partir do CO_2 e água, realizando um processo denominado quimiossíntese. (CARDOSO, 1992; SYLVIA et al., 1998).

A oxidação dos íons amônio produz nitritos como resíduos nitrogenados, que são liberados para o meio ambiente. Os nitritos liberados pelas bactérias nitrosas são absorvidos e utilizados como fonte de energia por bactérias. Da oxidação dos nitritos formam-se os nitratos que, liberados para o solo, podem ser absorvidos e metabolizados pelas plantas. À conversão

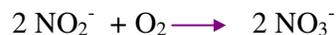
do nitrito (ou ácido nitroso) em nitrato (ou ácido nítrico) dá-se o nome de nitratação. (CARDOSO, 1992; SYLVIA et al., 1998).

A nitrificação é um processo biológico, realizado por bactérias, que ocorrem naturalmente em sistemas onde existam condições aeróbias e a presença de nitrogênio amoniacal. (BREMNER & BUNDY, 1974; VICTORIA, 1992). O processo de nitrificação produz energia que, liberada é utilizada pelas bactérias nitrificadoras para reduzir o dióxido de carbono, da mesma forma que as plantas autotróficas utilizam a energia luminosa para a redução do dióxido de carbono. Tais organismos são classificados de acordo com suas fontes de C N e obtenção de energia como autotróficos quimiossintéticos ou quimiolitotróficos (diferentes dos autotróficos fotossintéticos, como as plantas e as algas). O processo de nitrificação ocorre em duas etapas: a nitrificação (transformação da amônia em nitrito) e a nitratação (transformação do nitrito em nitrato). Estes processos são realizados por grupos bacterianos distintos, denominados nitrificação, realizado por bactérias nitritadoras ou nitrosas e o processo de nitratação, realizado pelas bactérias nitradoras ou nítricas (WINOGRADSKY, 1890; DOMMERGUES & MANGENOT, 1970).

As bactérias nitritadoras pertencentes aos gêneros *Nitrosomonas* e *Nitrosococcus* (BERGEY'S, 1939) são responsáveis pela seguinte reação de transformação de amônia em nitrito. (CARDOSO, 1992; SYLVIA et al., 1998).



O nitrito é tóxico para as plantas superiores, mas raramente se acumula no solo, pois é a fonte nitrogenada para um segundo grupo de bactérias nitradoras, pertencentes aos gêneros *Nitrobacter*, que oxidam o nitrito, formando nitrato (NO_3^-), novamente com liberação de energia:



O nitrato é a forma sob a qual quase todo o nitrogênio se move do solo para o interior das raízes.

Em estudo quantitativo dos grupos de microrganismos do solo, verificaram que o único grupo que apresentou correlação positiva entre o número de bactérias presentes nos

solos e condições de produção deste solo, foi o grupo fisiológico de bactérias nitrificadoras (SORIANO, 1968).

Estudando a evolução química e microbiológica do processo de nitrificação no solo (AMOR ASUNCIÓN, 1965) verificou que existe relação direta entre bactérias nitrificadoras e teor de nitratos no solo.

Ao nível bioquímico, o processo de nitrificação envolve muito mais do que a oxidação seqüencial da amônia para nitrito, pelas nitrossomonas, e nitrito para nitrato, pelas nitrobacter. Varias reações intermediárias e enzimas estão envolvidas no processo. Além disso, deve ser considerada a resposta dos organismos nitrificadores às condições do ambiente em que se encontram, (DEMOLON, 1965).

Segundo Adams & Martin (1984) a acidez inibe a produção de nitrato em solos que recebem aplicação de amônio, assim como a nitrificação é favorecida pela calagem. A taxa de nitrificação decresce abaixo de pH 6,0 em água e é insignificante abaixo de pH 4,5 em água (ROSOLEM et al., 2003) que também citam que a calagem geralmente usada na correção da acidez do solo aumenta a mineralização de compostos orgânicos e o processo de nitrificação nos solos.

Trabalho desenvolvido por Brum (1975) em solos do Rio Grande do Sul, sobre diferentes sistemas de cultivo de solos, mostrou que a ocorrência de bactérias nitrificadoras foi significativamente maior nas amostras coletadas a 0-15 cm de profundidade do que as coletadas a 15-30 cm, e que em todos os tratamentos analisados, quando foi usada calagem ocorreu um aumento no número de bactérias nitrificadoras.

Segundo Bremner & Bundy (1974), a eficiência da nitrificação oscila entre 85 e 99% em condições de solo de boa fertilidade e aeração, ocorrendo eficiências menores fora das faixas adequadas de pH, sendo o controle de pH um dos fatores mais decisivos na eficácia do processo. (BREMNER & BRUNDY, 1974). Contudo, a concentração de hidrogênio iônico das soluções do solo é o principal fator no controle do desenvolvimento microbiano (VICTORIA et al., 1992).

Tisdale & Nelson (1970) citam que os fatores que influenciam na atividade das bactérias nitrificadoras têm um efeito pronunciado sobre a quantidade de nitratos produzidos e conseqüentemente a disponibilidade do nitrogênio às plantas. Os fatores que afetam a presença e atividade de bactérias nitrificadoras nos solos são: abundância do íon amônio, pH, aeração, umidade e temperatura do solo (DOMMERMUES & MANGENOT, 1970).

Embora a nitrificação seja beneficiada por valores de pH próximos da neutralidade, o processo é acidófilo, particularmente na primeira fase da nitrificação. A calagem eleva o pH,

que estimula as atividades das bactérias nitrificantes, responsável junto com os fertilizantes nitrogenados pela reacidificação do solo. Entretanto, Rosolem et al. (2003) sugerem em seu trabalho dinâmica do nitrogênio no solo em razão da calagem, que a absorção de nitrogênio pelas plantas, mais sua incorporação à massa microbiana do solo, neutraliza os efeitos do adubo nitrogenado amoniacal sobre o pH do solo.

Quanto à influência do pH do solo sobre os microorganismos verifica-se que a atividade dos amonificadores é indiferente à reação da solução, entretanto, a atividade dos nitrificadores é extremamente dependente do pH (DOMMERGUES & MANGENOT, 1970). As bactérias nitrificadoras geralmente são caracterizadas como neutrófilas (BRUM, 1975; BERGEY'S, 1939).

O número de bactérias encontradas por grama de solo é extremamente alto, e de uma maneira geral, os extratos superiores de solo apresentam maior número total de bactérias, decrescendo o número nos estratos inferiores.

São igualmente importantes apesar de não ocorrerem com muita frequência, grupos de bactérias Gram-negativas como as cianobactérias, colonizadoras primárias de novos solos e as bactérias nitrificadoras, os grupos oxidantes de enxofre, e as fixadoras de N_2 .

Os microrganismos edáficos se distribuem de maneira bastante heterogênea no solo, ocupando microhabitats produzidos nos poros das partículas de solo. Como consequência os resultados dos estudos microbiológicos de solos representam uma média dos organismos que ocupam os diferentes microhabitats. Estes organismos podem ser estudados utilizando-se várias técnicas de microbiologia clássica que compreendem processos de enriquecimento para facilitar a detecção de microrganismos pouco frequentes, sistemas de contagem direta utilizando preparações microscópicas de quantidades conhecidas de solo tingidos com corantes ou agentes fluorescentes específicos, técnicas de semeadura em massa, determinação do número mais provável, ou qualquer outro método clássico, entretanto estes métodos não são capazes de reproduzir as condições ecológicas de vida dos organismos no solo.

Winogradsky (1949), desenvolveu o método de contagem direta de colônias em placas de sílica gel, usando grânulos de solo (micro agregados) na semeadura. O método apresenta boas condições de reprodução do habitat solo, entretanto é bastante trabalhoso e apresenta o problema de poder conter mais de uma bactéria em cada grânulo de solo. Neste método uma colônia poderá ser gerada por mais de um organismo.

Soriano (1966), desenvolveu uma metodologia de determinação quantitativa de microrganismos, utilizando plaqueamento em duas camadas de sílica gel utilizando solo dispersado.

Um dos princípios básicos que devem cumprir os métodos de contagem de microrganismos do solo é que os mesmos devem representar o mais próximo possível as condições dos solos (WINOGRADSKY, 1949).

Assim, este trabalho tem por objetivo avaliar o efeito de dosagens e modo de aplicação de calcário após cinco anos de manejo em sistema de plantio direto implantado sobre pastagem nativa, na população de bactérias nitrificadoras.

2.2 Material e Métodos

O experimento selecionado para o estudo do efeito do modo e dosagens de aplicação de calcário em um sistema de plantio direto sobre bactérias nitrificadoras, foi instalado em 1996, na área experimental do Departamento de Solos da UFSM, conforme descrito no capítulo 1 item 1.1. O solo, classificado como Argissolo Vermelho Distrófico arênico, (EMBRAPA, 1999) antes classificado como Podzólico Vermelho Amarelo, pertence à unidade de mapeamento São Pedro, com declividade de 2-5%.

Neste estudo foram efetuadas coletas em blocos ao acaso com 4 repetições: testemunha (sem calcário); B) quantidade recomendada pelo método SMP para pH 6 (100%), incorporada ao solo na profundidade de 20 cm; C) quantidade recomendada pelo método SMP para pH 6 (100%), distribuída na superfície do solo; D) metade da quantidade recomendada pelo método SMP para pH 6 (50%), distribuída na superfície do solo; E) um quarto da quantidade recomendada pelo método SMP para pH 6 (25%), distribuída na superfície do solo. As parcelas mediam 5 x 10 metros, com área de 2 m entre parcelas e 5 m entre blocos. Foram selecionados pontos nas parcelas, onde foram coletadas as amostras de solo com pá de corte, nas profundidades de 0-5; 5-10; 10-20 cm embaladas em sacos de polietileno. As amostras foram analisadas no Laboratório de Biologia do Solo e Ambiente, para análises microbiológicas.

Para a determinação quantitativa de população de bactérias nitrificadoras, foi realizada uma dispersão de solo conforme método descrito por Molina & Spain (1946). Seguiu-se a semeadura do solo dispersado sobre uma camada de sílica gel e posterior adição de uma mistura composta por calcário, silicatos alcalinos e uma mistura ácida, que se neutralizam formando uma segunda capa fina de sílica gel que contem os nutrientes específicos para o desenvolvimento do grupo bacteriano em estudo, os quais se difundem na capa inferior de sílica gel, conforme metodologia descrita por Amor Asunción (1965).

Após a geleificação total das placas em superfície horizontal, estas foram incubadas em estufa a 28 - 30°C.

O experimento foi realizado em plaqueamento triplicado, e após testes preliminares, a diluição que melhor respondeu no presente foi a de 25 mg de solo por placa. Após 10 dias de incubação a 28-30° C foram iniciadas observações e contagens das colônias desenvolvidas nas placas, partindo do princípio de que cada bactéria semeada junto com o solo formou uma colônia. As contagens foram realizadas a cada 5 dias por um período de 60 dias.

Os resultados obtidos foram analisados através da análise da variância e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2.3 Resultados e Discussão

As bactérias nitrificadoras formam colônias transparentes, planas circulares ou ovaladas, variando em alguns milímetros de diâmetro, que podem ser visualizadas nas placas de sílica gel através da ação dos ácidos nitroso ou nítrico formados pelas bactérias pela dissolução da camada de calcário adicionada na segunda capa (DOMMERGUES & MANGENOT, 1970; SORIANO, 1966; BERGEY'S, 1939).

O crescimento das colônias de bactérias nitrificadoras foi observado a cada cinco dias. Na Figura 1 pode-se observar a ocorrência de colônias aos 60 dias de incubação.

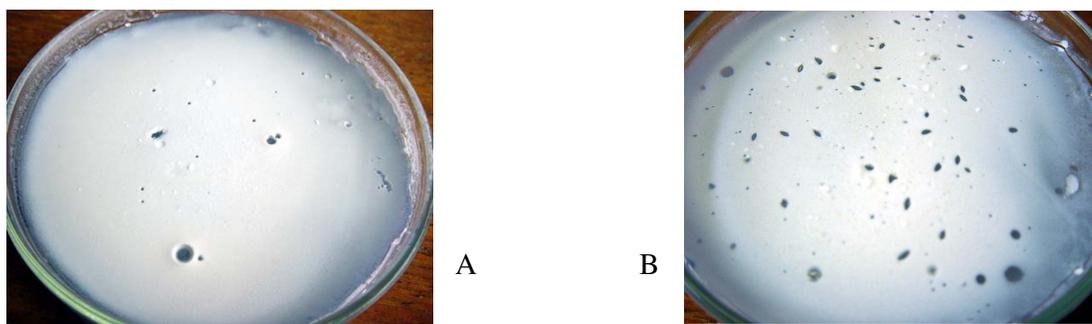


Figura 1 - Colônias de bactérias nitrificadoras desenvolvidas em placas de sílica-gel com solo disperso. A= testemunha, zero de aplicação de calcário B= 100% de calcário aplicado em superfície.

O número de bactérias nitrificadoras por grama de solo nos diferentes tratamentos e o pH do solo pode ser observada na Tabela 1 e Figura 1. A maior população de bactérias nitrificadoras ocorreu nos tratamentos com calcário 100% na superfície, 100% incorporado e 50% na superfície, sendo que no solo sem calcário a população foi bastante baixa na profundidade de 0-5 centímetros. Ocorrências semelhantes na proporção da população de colônias de bactérias nitrificadoras foram observadas na profundidade de 5-10 centímetros,

sendo que quantitativamente o número de colônias foi maior em relação às profundidades de 0-5 centímetros e 10-20 centímetros. A população de bactérias na profundidade de 10-20 centímetros foi inferior as demais dentro de cada modo de aplicação de calcário, sendo que na aplicação 100% na superfície foi superior aos demais tratamentos (Tabela 1).

Slangen & Kerkhoff (1984), trabalhando com inibidores de nitrificação, citam que os números de bactérias nos solos são bastante baixos, representando 0,01-0,1% de todas as bactérias de um solo. Grundmann et al. (2001), utilizando para contagem o NMP (número mais provável) de bactérias, encontrou entre 300 e 400 bactérias por grama de solo. Brum (1975), em trabalho de levantamento de bactérias nitrificadoras em vários tipos de manejo de solo, encontrou um máximo de 13.000 bactérias por grama de solo, quando o solo foi incubado em condições ideais de pH, temperatura e umidade.

O efeito do pH do solo sobre o número de bactérias nitrificadoras pode ser visualizado na tabela 1 e figura 2. Quando no intervalo 4,5 - 5,5 ocorreu a maior população de bactérias nitrificadoras, entretanto quando estes valores estavam próximo de 4 ocorreu um número inferior destes organismos Para Rosolem et al. (2003), o limite de pH para o processo de nitrificação é dependente de um conjunto de outros fatores químicos e físicos de um solo, ficando limitado em camadas de solo com pH da ordem de 4,0. Alexander (1977) cita que a nitrificação e o número de bactérias diminuem marcadamente em pH inferior a 6, 0, podendo ocorrer, entretanto o processo em pH 4,5 em alguns solos (ADAMS & MARTIN, 1984).

Tabela -1 Número de bactérias nitrificadoras por grama de solo e pH do solo em diferentes dosagens e modos de aplicação de calcário, Santa Maria, RS, 2003.

Tratamentos Calcário	Número de bactérias			pH		
	(0-5cm)	(5-10cm)	(10-20cm)	(0-5cm)	(5-10cm)	(10-20cm)
A) Sem calcário	197d*	575d	332b	4,05c	4,02b	4,17b
B) 100% incorporado	812ab	1042ab	387b	4,95b	5,47a	5,22a
C) 100% superfície	937a	1067a	625a	5,97a	5,42a	4,85ab
D) 50% superfície	810ab	895abc	480ab	4,952b	4,8ab	4,35b
E) 25% superfície	365d	612d	373b	4,22bc	4,2b	4,17b

*A = 0% calcário; B = 100% incorporado; C = 100% superfície; D = 50% superfície; E = 25% superfície.

* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de profundidade.

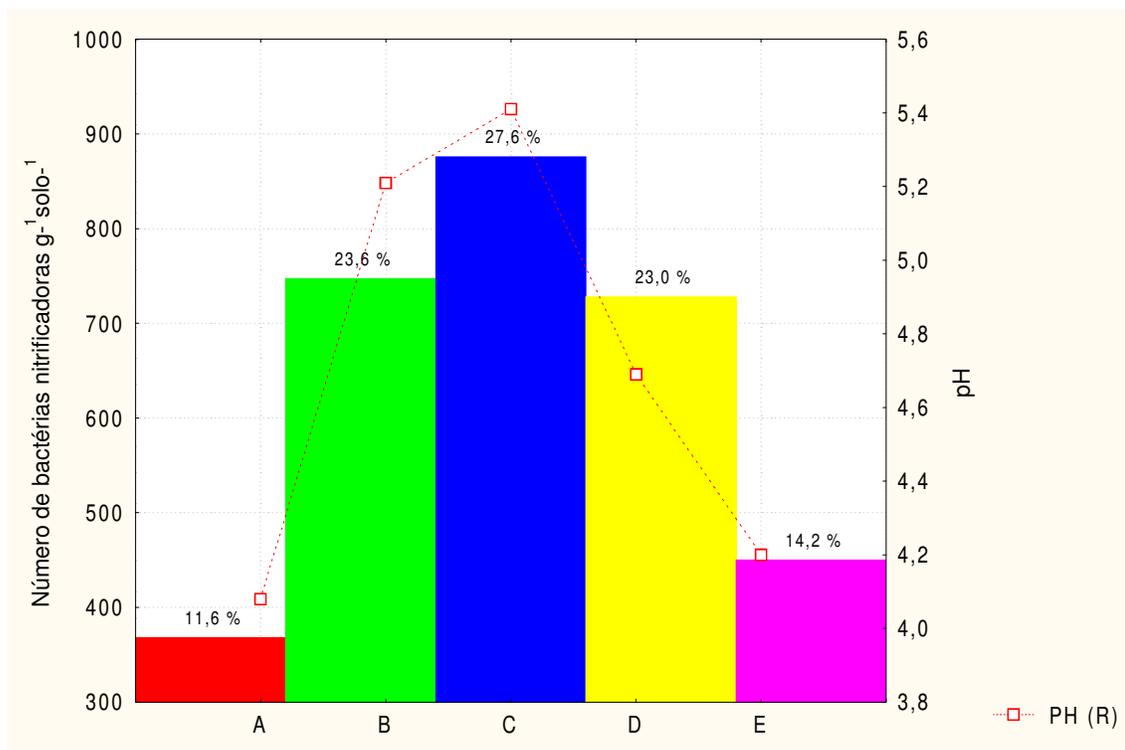


Figura - 2 Número de bactérias nitrificadoras por grama de solo em relação ao pH. Tratamentos: A) testemunha (sem calcário); B) quantidade recomendada pelo método SMP para pH 6 (100%), incorporada ao solo na profundidade de 20cm; C) quantidade recomendada pelo método SMP para pH 6 (100%), distribuída na superfície do solo; D) metade da quantidade recomendada pelo método SMP para pH 6 (50%), distribuída do solo; E) um quarto da quantidade recomendada pelo método SMP para pH 6 (25%), distribuída na superfície do solo.

A influência do pH sobre a atividade dos microrganismos do solo que controlam os processos de amonificação, nitrificação, desnitrificação e fixação biológica é bastante conhecida (FREIRE et al., 2000). As condições de pH para as nitrificadoras são próximas à neutralidade, e a nitrificação é prejudicada em meio de reações extremas de pH, sendo muito lenta em pH inferior a 5,0 (GAUCHER, 1968).

Trabalhos desenvolvidos estudando a dinâmica do N e calagem afirmam a importância da calagem sobre o número de bactérias nitrificadoras e a intensidade do processo de nitrificação. A intensidade da nitrificação é maior quando o pH é próximo da neutralidade, o que justifica o efeito da calagem sobre o processo de nitrificação (DOMMERMUES &

MANGENOT, 1970). Segundo Brum (1975), a nitrificação em pH inferior a 6,5 torna-se progressivamente retardada, sendo quase nula a pH 3,9. A acidez inibe a produção de nitrato em solos que recebem aplicação de amônio, assim como a nitrificação é favorecida pela calagem. A taxa de nitrificação decresce abaixo de pH 6,0 em água e é insignificante abaixo de pH 4,5 em água (ADAMS & MARTIN, 1984).

Em trabalho estudando a disponibilidade de nitrato em solos em razão da calagem (SILVA & VALE, 2000) citam que a calagem interferiu na nitrificação, notando que nos solos que receberam calcário, houve maior disponibilidade de nitrato.

No sistema de plantio direto a calagem é realizada na superfície do solo, trabalhos são divergentes sobre a modificação do pH no perfil do solo quando realizada calagem em cobertura.

Trabalhando com dinâmica do nitrogênio no solo em razão da calagem, Rosolem et al. (2003) citam que o calcário aplicado na superfície proporcionou elevação do pH de modo mais uniforme no perfil do que quando o mesmo foi incorporado. O calcário incorporado proporcionou aumento significativo do pH na camada de 5-10 cm de profundidade e um pequeno aumento na camada seguinte, de 10-20 cm. Na camada mais superficial, praticamente não houve elevação do pH.

Fato semelhante pode ser observado na Tabela 1 e Figura 3, em que o tratamento com calcário 100% incorporado, embora tenha apresentado um pH um pouco abaixo do tratamento 100% em superfície, se verificado em diferentes profundidades apresentou pH levemente superior nas profundidades 5 a 10 e 10 a 20 cm de coleta, entretanto o número de bactérias não apresentou a mesma tendência, o que evidencia o maior efeito profundidade de coleta no tratamento do que o efeito pH.

Caíres & Fonseca (2000) referem-se ao fato de que como os materiais corretivos utilizados são pouco solúveis e os produtos da reação do calcário têm mobilidade limitada, a ação da calagem normalmente fica restrita às camadas superficiais do solo.

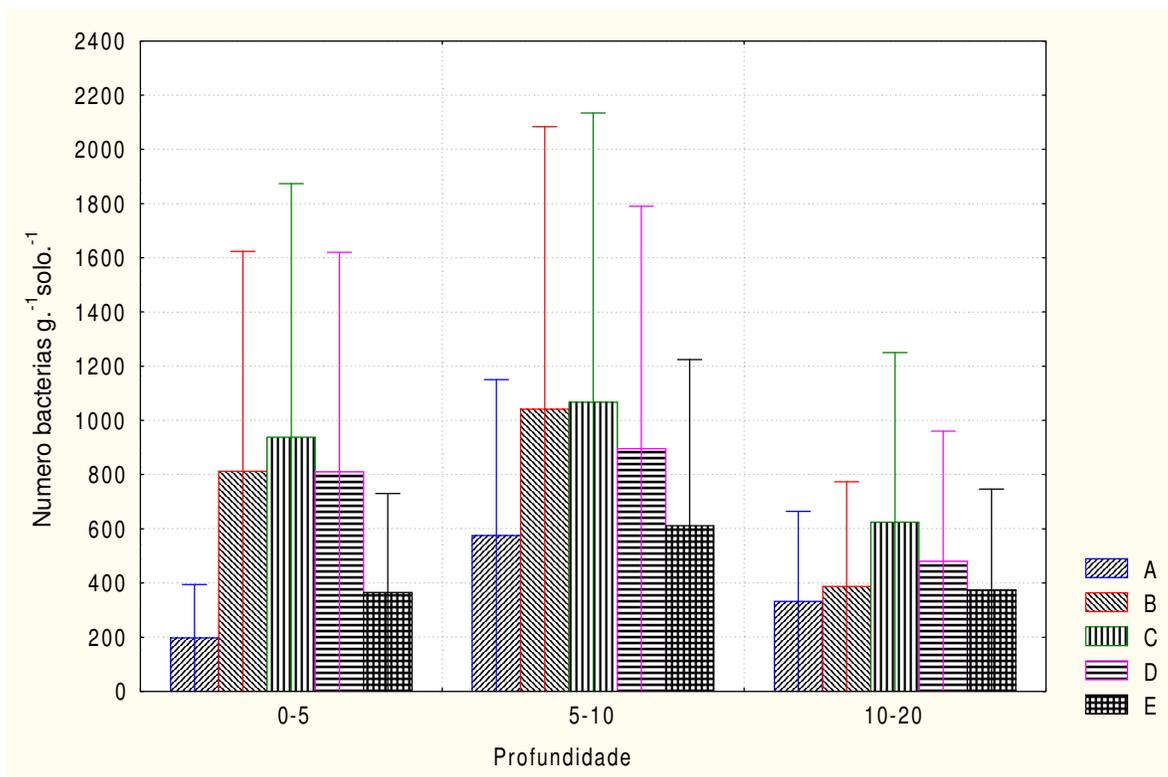


Figura -3 Número de bactérias nitrificadoras por grama de solo em relação à profundidade de coleta do solo. Tratamentos: A) testemunha (sem calcário); B) quantidade recomendada pelo método SMP para pH 6 (100%), incorporada ao solo na profundidade de 20cm; C) quantidade recomendada pelo método SMP para pH 6 (100%), distribuída na superfície do solo; D) metade da quantidade recomendada pelo método SMP para pH 6 (50%), distribuída do solo; E) um quarto da quantidade recomendada pelo método SMP para pH 6 (25%), distribuída na superfície do solo.

Ao observar a Figura 3, verifica-se que houve variação no número de bactérias em relação à profundidade sendo que de 5 a 10 cm foi encontrado o maior número de bactérias, seguida de tratamentos coletados a profundidade de 0 a 5 cm, ocorrendo, no caso do material coletado a profundidade de 10 a 20 cm, uma drástica redução no número de bactérias nitrificadoras.

ARDAKANI et al. (1974) trabalhando com solos coletados em profundidades de 0 a 15cm e 15 a 30cm, observaram que a densidade populacional de bactérias nitrificadoras era mais alta na primeira camada, onde a concentração de substratos era também mais alta.

Tabela - 2 Teores de fósforo, potássio, cálcio, magnésio, matéria orgânica, e alumínio em diferentes modos de aplicação de calcário, Santa Maria, RS, 2003.

Tratamentos	Fósforo, mg/dm ³			Potássio, cmol _c /dm ³		
	(0-5cm)	(5-10cm)	(10-20cm)	(0-5cm)	(5-10cm)	(10-20cm)
A) Sem calcário	31,42	22,90	21,40	196,50	116,50	107,50
B) 100% incorporado	25,30	29,77	21,80	172,50	121,00	104,50
C) 100% superfície	27,35	19,57	11,00	177,00	122,50	108,50
D) 50% superfície	37,12	43,37	38,30	146,50	102,00	107,00
E) 25% superfície	26,97	24,00	19,00	174,50	108,00	101,50
Correlação: 0,17174				Correlação: -0,03885		
	----- Cálcio, cmol _c /dm ³ -----			----- Magnésio, cmol _c /dm ³ -----		
A) Sem calcário	4,35	3,57	3,47	0,62	0,42	0,50
B) 100% incorporado	6,27	7,00	6,27	1,57	1,62	1,350
C) 100% superfície	8,32	6,40	4,75	2,47	1,92	1,35
D) 50% superfície	6,30	4,90	4,07	1,37	1,02	0,72
E) 25% superfície	4,30	3,35	2,92	0,90	0,60	0,52
Correlação: 0,693514				Correlação: 0,740697		
	----- Matéria orgânica, % -----			----- Alumínio, cmol _c /dm ³ -----		
A) Sem calcário	2,40	1,77	1,55	0,92	1,40	1,45
B) 100% incorporado	2,10	1,77	1,62	0,10	0,05	0,15
C) 100% superfície	2,57	1,80	1,57	0,00	0,05	0,65
D) 50% superfície	2,62	1,60	1,55	0,30	0,72	1,45
E) 25% superfície	2,22	1,67	1,51	0,505	1,07	1,75
Correlação: 0,152987				Correlação: -0,6383		

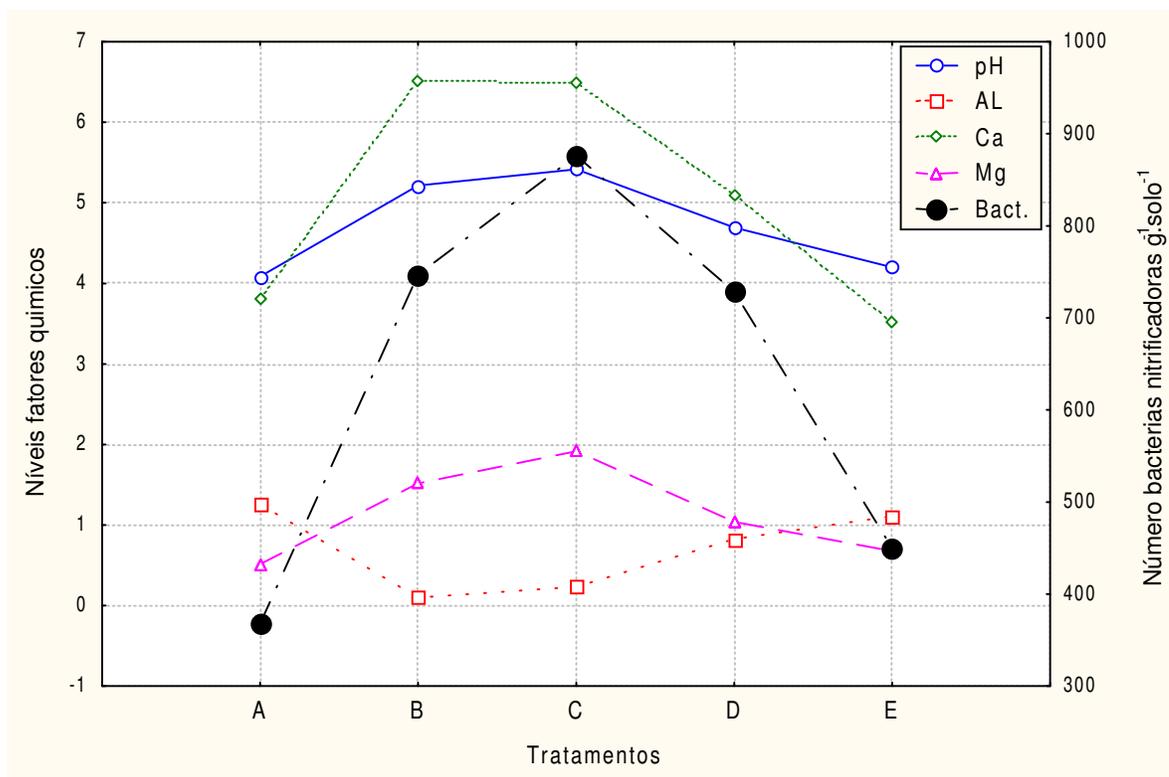


Figura - 4 Número de bactérias nitrificadoras por grama de solo, valores de pH, teores de alumínio (AL), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) nos tratamentos: A) testemunha (sem calcário); B) quantidade recomendada pelo método SMP para pH 6 (100%), incorporada ao solo nas profundidades de 20cm; C) quantidade recomendada pelo método SMP para pH 6 (100%), distribuída na superfície do solo; D) metade da quantidade recomendada pelo método SMP para pH 6 (50%), distribuída do solo; E) um quarto da quantidade recomendada pelo método SMP para pH 6 (25%), distribuída na superfície do solo.

Pode-se verificar (Tabela 1), fatores que influíram no baixo número de bactérias nitrificadoras em alguns tratamentos e em profundidade: o pH baixo que ocorreu nos tratamentos sem aplicação de calcário e 50% do calcário aplicado na superfície, pois as bactérias nitrificadoras são neutrófilas. O decréscimo no número de bactérias nitrificadoras observado nas amostras coletadas na camada 10 a 20 cm de profundidade possivelmente seja devido às condições de aeração do solo. A ocorrência de bactérias e a produção de nitratos são inibidas por tensões fracas de oxigênio. As bactérias nitrificadoras consomem entre 0,5 e 1,5 moles de oxigênio por molécula de substrato energético oxidado, são bactérias estritamente

aeróbicas (WINOGRADSKY, 1949; DOMMERGUES & MANGENOT, 1970; ROSOLEM et al., 2003).

Dos atributos químicos estudados, o pH parece exercer influência na população de bactérias nitrificadoras, bem como cálcio e magnésio e alumínio, os quais apresentaram correlações 0,760504, 0,693514, 0,740697 e -0,6383, respectivamente enquanto que para o fósforo, potássio e matéria orgânica não foi possível evidenciar a ação na ocorrência sobre esses organismos (Tabela 2, Figura 3 e 4). O pH inferior a 4,3 não favoreceu o desenvolvimento de colônias de bactérias nitrificadoras.

2.4 Conclusões

As aplicações de calcário nas doses de 100% aplicado na superfície, 100% incorporada e 50% na superfície apresentaram os maiores números de colônias de bactérias nitrificadoras.

O aumento do pH aumentou o desenvolvimento de colônias de bactérias nitrificadoras.

A população de bactérias nitrificadoras mostrou-se associada à profundidade, sendo que solo coletado de 5 – 10cm mostra a maior quantidade desses organismos, apresentando uma redução bastante grande na profundidade de 10-20 centímetros.

2.5 Referências bibliográficas

ALEXANDER, M. **Introduction to Soil Microbiology**, Willey, New York., 1977.

ADAMS, F.; MARTIN, J. B. Liming effects on nitrogen use and efficiency. In: HAUCK, R. D. (Ed.). **Nitrogen in crop production**. Madison, American Society of Agronomy, 1984. P. 417-426.

ARDAKANI, M.S.; SCHULZ, R.K. & MACLAREN, A.D. A kinetic study of ammonium and nitrite oxidation in a soil field plot. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 38:273-8. 1974.

AMOR ASSUNCIÓN, M.J. Determinación de Azotobacter en cajas de silico-gel sin secado. *Cienc. Y invest.*, 21:368-370, 1965.

BERGEY'S, D. H. *Manual of determinative bacteriology*. Baltimore, 1939. 1032p.

BREMNER, J.M. & BUNDY, L.G. Inhibition of nitrification in soils by volatile sulfur compounds. *Soil Biol. Biochem.*, Oxford, 6:161-165, 1974.

BRUM, A. C. R. Efeito de manejo e exploração agrícola na densidade populacional de bactérias nitrificadoras, em solo da unidade de mapeamento Santo Ângelo. Santa Maria, 1975, 64p. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Santa Maria. 1975.

CARDOSO, E. J. B. N. **Microbiologia do Solo**. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. 360p.

CAIRES, E.F. & FONSECA, A. F. Absorção de nutrientes pela soja cultivada no sistema de plantio direto em função da calagem na superfície. **Bragantia**, Campinas, 59 (2): 213-220, 2000.

COLEMAN, D. C., HENDRIX, P. F. **Invertebrates as webmasters in ecosystems**. CABI Publishing, 2000. 336p.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO – RS/SC. (2004). **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Núcleo Regional Sul, 10 ed. Porto Alegre, 2004. 400p.

DEMOLON, A. Evolución bioquímica del nitrógeno y del azufre. In: *Dinâmica del suelo*. Barcelona, Omega S.A. 1965, v.1, cap 16, p. 460-484.

DOMMERGUES, Y. & MANGENOT, F. **Cycle del Nitrógeno**. In: *Ecologie Microbienne du soil*. Paris, Masson et cie. Editeur. p. 155-288. 1970.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos (Rio de Janeiro, RJ). **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Brasília: Embrapa produção de informações; Rio de Janeiro, 1999. 412p.

FREIRE, F.M.; VASCONCELLOS, C.A.; FRANÇA, G.E. de. Manejo da fertilidade do solo em sistema plantio direto. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.22, n.208, p.49-62, 2000.

GAUCHER, G. Las propiedades biológicas Del suelo. In: El suelo e sus características agronomicas. Barcelona, Omega S.A., cap.13, p.410-449, 1971.

GRUNDMANN, G. L., DECHESNE, A., BARTOLI, F., FLANDROIS, J. P., CHASSE, J. L., KIZUNGU, R. **Spatial Modeling of Nitrifier Microhabitats in Soil**. Soil Sci Soc Am J 2001 65: 1709-1716

LAL, R.; KIMBLE, J.M.; FOLLETT, R.F.; STEWART, B.A. *Soil Processes and the Carbon Cycle*. CRC Press, Boca Raton, FL, 609p, 1998.

MOLINA, J. S., SPAINI, L. S. Aplicación del metodo de dispersión de Boyoucus al calculo de bacterias en el suelo. Ver. Arg. Agron. Buenos Aires, 13 (3). 1946. 181-190p.

ROSOLEM, C. A.; FOLONI, J. S. S. & OLIVEIRA, R. H. de. Nitrogen dynamics in soil as affected by liming and nitrogen fertilization, with straw on the soil surface. *Pesq. agropec. bras.* 2003, v.38, n.2, p.301-309.

SLANGEN, J. H.G. & P. KERKHOFF. 1984. Nitrification inhibitors in agriculture and horticulture: **A literature review**. Fert. Res. 5: 1-76

SYLVIA, D. M., FUHRMANN, J. J., HARTEL, P. G., ZUBERER, D. A. **Principles and Applications of Soil Microbiology**. Ed. Prentice-Hall International, 1998. 550p.

SORIANO, S. Metodo para la determinación cuantitativa de microorganismos del suelo. In: *Progressos en biología del suelo. Actas del Primer col. Lat. Amer. de Biología del Suelo.* Montivideu, 1966. 1: p.641-650.

SORIANO, S., AMOR ASUNSIÓN, M. J., DELLEPIANE, L. C. Metodo de analisis microbiológica cuantitativo del suelo en relación com su fertilidad. In: *Progressos em Biodinâmica e Produtividade do Solo.* Santa Maria, Pallotti, 1968. 533p.

TISDALE, S. L. & NELSON, W. L. El suelo y los fertilizantes nitrogenados. In: *Fertilidade de los suelos y fertilizantes.* Barcelona, Montaner yu Simon, S.A. 1970. Cap.5, p.138-165.

VARGAS, M. A. T. & HUNGRIA, M. **Biologia dos Solos do Cerrado.** Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. 524p.

VICTORIA, R.L. PICCOLO, M. C. & VARGAS, A.A.T. O ciclo do Nitrogênio. In: *Microbiologia do solo.* Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo 1992.360 p.

WAKSMAN, S. A. *Soil Microbiology.* New York, John Wiley & Sons, Inc., 1952, 290p.

WINOGRADSKY, S. **Recherches sur les organismes de la nitrification.** *Ann. Inst. Pasteur* 4, 213-231, 257. 1949.

CAPITULO III. ESTUDO MOLECULAR DE DUAS ESPÉCIES DE OLIGOQUETAS PRESENTES NO SISTEMA DE PLANTIO DIRETO

3.1 Introdução

O Filo Annelida inclui as Classes Polychaeta, Oligochaeta (oligoquetas) e Hirudinea (sanguessugas). A característica mais evidente do filo é a metameria, ou seja, a divisão do corpo em anéis ou segmentos dispostos ao longo de um eixo ântero-posterior, com simetria bilateral. Os anelídeos são animais triblásticos, em seu desenvolvimento embrionário, formam-se três folhetos embrionários, que dão origem a todas as partes do seu corpo. São celomados (possuem uma cavidade corporal delimitada pelo mesoderma). Pelo celoma circulam líquidos que facilitam a distribuição de materiais entre as várias partes do corpo, na cavidade celomática ficam alojados os órgãos do animal. Em toda a extensão do corpo, a maioria dos anelídeos apresenta cerdas, expansões de quitina que se projetam externamente à cutícula (STORER, 1971).

Os egípcios foram os primeiros a reconhecer a importância das oligoquetas, atribuindo a fertilidade das margens do rio Nilo a atividade destes organismos. A importância das oligoquetas para o solo foi ressaltada por Gilbert White, o qual, resumiu suas observações em uma frase que designou as oligoquetas como “The intestines of the earth”. Até quase o final do século XX as oligoquetas eram vistas como pragas agrícolas, que deviam ser combatidas. Deve-se aos trabalhos de Darwin o reconhecimento do real papel das oligoquetas na natureza. Com o livro “The origin of the species”, Darwin demonstrou que a ecologia animal tem uma direção com dois sentidos, os animais sofrem a influência do meio, mas também influem sobre o meio. Embora os escritos de Darwin tenham mais de um século, os pesquisadores estudavam apenas um dos sentidos, a dependência dos organismos em relação ao ambiente (ADIS & RIGHI, 1989).

Um grande papel desempenhado pelas oligoquetas na natureza é o processamento e a incorporação da matéria orgânica ao solo (LEE, 1985; BAROIS et al., 2000; CHAUVEL et al., 1999; ANDRÉN et al., 1988; BUCKERFIELD et al., 1997). As oligoquetas apresentam também um elevado teor protéico, caracterizando um grande potencial na geração de alimentos. A minhocultura constitui-se em uma excelente alternativa para redução de impactos ambientais, na bioacumulação de metais pesados, redução do volume de lixo, sendo uma importante forma de tratamento de poluentes, reduzindo desta forma, problemas de saúde pública. Só com o recente desenvolvimento da pedobiologia, aumentaram os estudos,

especialmente no que se refere aos grupos animais do solo, alguns dos quais funcionando como bioindicadores de condições do solo (GILLER et al., 1998; ANTONIOLLI et al., 2002).

Vários trabalhos foram desenvolvidos (BROWN et al., 2000; DECAENS et al., 1994; LEE, 1985; BOUCHÉ, 1977) sobre ecologia de oligoquetas, entretanto na área de taxonomia vários autores afirmam ser um processo bastante trabalhoso e especializado, o que resulta em poucas informações e muitas discrepâncias no sistema de classificação. A maioria dos caracteres morfológicos e anatômicos são variáveis, segundo o meio onde se desenvolvem e as condições ecológicas (WALSH et al., 1997; MORGAN & MORGAN, 1992; EDWARD & BOHLEN, 1992).

A taxonomia de Oligoquetas que começou com o trabalho de Savigny em 1826, foi seguida por vários pesquisadores, como Omodeo (1956). Bouché (1972) e Jamielson (1988) melhoraram a compreensão da classificação, estabelecendo novos grupos, mas ainda persistem muitas discrepâncias na taxonomia desses grupos.

A família Lumbricidae foi descrita por Claus em 1876, onde pode se citar o gênero *Eisenia*, descrita por Malmam em 1877 e a espécie *Eisenia foetida* por Savigny em 1826, conhecida como “vermelha da califórnia”, cujo comprimento varia de 32mm à 130mm, com diâmetro de 2mm à 4mm. O número de segmentos fica entre 80m a 110. O corpo é cilíndrico e o protostômio epibólico. O clitelo se estende do 24º, 25º, 26º, 27º – 31º e 32º segmento. Os tubérculos pubertários se estendem desde 1/2, 27º, 28º à 31º e 32º segmento. Há 2 receptáculos seminais (KNAPPER, 1990). Esta espécie apresenta clitelo sobressalente avermelhado, visível principalmente na fase de reprodução, corpo vermelho escuro com anéis finos (PEIXOTO, 1988). A *E. foetida* embora viva em matéria orgânica em decomposição tem condições de canalizar em solo arenoso e paulatinamente preenchê-lo em função de segmentos de canais com matéria orgânica já reelaborada (KNAPPER et al., 1990). Segundo Ferruzzi (1989), a *Eisenia foetida* apresenta longevidade de 16 anos, prolificidade de cerca de 1500 crias por ano e dejeções muito rica em flora microbiana (2×10^{12} colônias/grama), o que significa milhões de bactérias vivas e ativas por cada grama de húmus produzido.

Os organismos do gênero *Eisenia foetida*, descrito por Savigny em 1826 são dos mais comumente usados no manejo de desperdícios orgânicos, e também em ecotoxicologia, fisiologia e estudos de genética, principalmente porque são gêneros com uma distribuição mundial, seus ciclos de vida são curtos, tolerantes a variações de umidade e de fácil manipulação (DOMÍNGUEZ et al., 2000; REINECKE & VILJOEN, 1991). A *Eisenia foetida* é a espécie recomendada em bioensaios de toxicidade segundo a OECD (1984).

Na família Megascolicidae (MICHAELSEN, 1900) pode se citar o gênero *Pheretima* (Kimberg, 1866), conhecida como “puladora ou colarinho branco”. Neste gênero ocorre grande número de cerdas por segmento. Apresenta de 1 a 6 pares de espermatécas entre os segmentos 3 a 9. Este gênero possui micronefrídeos e as próstatas possuem ductos (KNAPPER, 1990). Este gênero, no Rio Grande do Sul, se encontra em hortas, jardins e solos cultivados, podendo reagir na presença de agrotóxicos com contração mioclônica de grupos musculares de diversos anéis (com mais freqüência com localização pós-clitelar) com eliminação de secreção amarela através dos poros dorsais e com diminuição dos reflexos superficiais (KNAPPER, 1981).

A diversidade dos seres vivos baseia-se em última instância na diversidade genética que está codificada nos genes, segmentos de moléculas de DNA. Na área de microrganismos de solos existem trabalhos estudando a biodiversidade de microrganismos do solo baseado em caracterização genética (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; MCORIST et al., 2002). Na área microbiológica, técnicas de cultivo e de DNA recombinante estão sendo usadas, com sucesso, para uma melhor compreensão da diversidade e do impacto da poluição no solo (KANEKO et al., 1977; ATLAS et al., 1991). Análises de DNA realizadas no solo revelaram que a comunidade bacteriana total pode ser consideravelmente maior do que a obtida pelos métodos tradicionais de cultivo (TORSVIK et al., 1999). Entretanto com alguns grupos de animais existem poucos trabalhos, entre os quais as oligoquetas. Segundo Lee (1988); Edwards & Bohlen (1992); Edwards (1998) e Morgan & Morgan (1982), metais pesados modificam características morfológicas de organismos como a coloração no caso de organismos do gênero *Eisenia*, o que torna difícil à identificação de espécies com os métodos tradicionais.

Atualmente, a utilização prática de oligoquetas para avaliar solos contaminados, está se tornando um fato relevante. WALSH et al. (1997), estudando DNA de oligoquetas adultas expostas a solos contaminados obtiveram resultados que indicaram dano no DNA genômico causado pela contaminação do solo. Assim, com a continuidade desse projeto, pode-se obter marcadores moleculares que poderão ser utilizados para identificar a presença desses organismos no solo.

Burgos et al. (2003), trabalhando com *Lumbricus rubellus*, em expressão genética para estudos de poluição de solos com metais pesados, citam que cobre e cádmium apresentam transcrições diferentes de genes quando em altas concentrações de exposição, afirmando que o estudo demonstra ser tecnicamente viável usar expressão de gene como um índice de exposição de poluição em organismos do ambiente.

Pop et al. (2003) utilizaram seqüenciamento de DNA de 18 espécies de *Lumbricus* alertando porem que no trabalho o objetivo foi a obtenção de dendogramas resultantes da análise de gens, tentando um estudo preliminar de agrupamento.

Segundo Morgan & Morgan (1992) com a utilização de métodos moleculares espera-se obter novas técnicas e mais precisas para identificação de oligoquetas citando que existem poucos estudos a respeito de DNA em oligoquetas.

A filogenia e identificação das oligoquetas ainda são bastante discutidas devido à falta de dados ou métodos analíticos usados, o uso de técnicas moleculares pode ser de grande importância. Entre a mais importante e promissora técnica está a utilização de seqüências de DNA (SAMBROOK et al., 1989; SANGER et al., 1977; HILLIS et al., 1993). O estudo do DNA das oligoquetas poderá oferecer informações sobre um grande número de caracteres, o que favorecerá a complementação da identificação morfológica (JAMES, 1998). Pop et al. (2003) citam que em trabalhos moleculares os resultados coincidiram parcialmente com os grupamentos de espécies nos sistemas taxonômicos clássicos baseados na morfologia, mostrando que as seqüências de DNA poderiam ser consideradas como caracteres adicionais úteis na taxonomia de oligoquetas.

Segundo Forbes (2003), o uso de protocolos moleculares tem sido extensivamente aplicado em quase todos os ramos da microbiologia, e uma das etapas cruciais é o isolamento efetivo do DNA. Mcorist et al. (2002) citam que a extração do DNA do material a ser estudado deve ser simples, rápido, reprodutível e de baixo custo, entretanto a obtenção do mesmo, a um custo reduzido, pode ser complexa. Encontram-se disponíveis no mercado kits a preços muitas vezes não compatíveis com o orçamento de pesquisa ou mesmo da rotina laboratorial.

Com o desenvolvimento de técnicas moleculares, a caracterização de oligoquetas torna-se mais rápida e precisa.

A obtenção de DNA genômico de boa qualidade e quantidade para amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) é fator crucial para trabalhos na área molecular (POP et al., 2003; KALIA et al., 1999; GIRAFFA et al., 2000; HIGGINS et al., 2001).

Técnicas moleculares tornaram-se ferramentas importantes no estudo genético de populações naturais de vários organismos. Oliveira et al. (2002) citam que a preservação adequada do DNA de um determinado organismo é fundamental para o sucesso no uso de técnicas moleculares como RAPD-PCR.

A busca por protocolos alternativos visa otimizar as condições de trabalho dos laboratórios de modo que os mesmos possam optar por reagentes que estejam mais facilmente

ao seu dispor, de baixo custo e que ofereçam menos riscos à saúde dos pesquisadores e menor dano ao meio ambiente quando descartados. Com este objetivo foram testados e adaptou-se um protocolo para extração do DNA das oligoquetas, buscando facilitar o trabalho de pesquisadores que buscam identificar e diferenciar as espécies de oligoquetas presente no ambiente.

3.2 Material e Métodos

Oligoquetas de duas espécies foram coletadas no experimento sobre o efeito de diferentes modos e doses de aplicação de calcário em sistema de plantio direto, na área experimental do Departamento de Solos da UFSM, com delineamento de blocos ao acaso com 4 repetições.

Foram coletados monólitos de solo de 25x25x25 cm aleatoriamente nas parcelas, armazenados em sacos de polietileno e mantidas em caixas de isopor até o transporte ao laboratório. As oligoquetas foram extraídas por catação manual das amostras de solo e lavadas em água corrente. Após caracterização visual de grupos idênticos, 10 indivíduos de *Eisenia foetida* e *Pheretima* sp. foram colocados em álcool a 70% para posterior caracterização segundo padrões morfológicos de espécies.

A identificação morfológica das espécies foi realizada após a fixação (Figura 1) com auxílio de lupas e usando-se as chaves de identificação de Righi (1984).

Outros 10 indivíduos adultos clitelados foram abertos e retirando-se todo o material existente no seu interior e órgãos internos. Fragmentos da parede muscular do corpo atrás da região clitelar foram cortados para análises (Figura 1), conforme metodologia descrita por Pop et al. (2003). Antes da extração do DNA o material foi mantido em geladeira, em água esterilizada por 24 horas para eliminação de qualquer substância que tenha ficado aderida.



Figura 1 – Seqüência da preparação do material das oligoquetas, fixação do organismo (A) e material pronto para extração do DNA (B).

No presente trabalho a maceração do tecido muscular para a extração do DNA foi realizada 24 hs após a morte e limpeza dos organismos em estudo

Vários métodos de extração de DNA já foram desenvolvidos e encontram-se disponíveis em bibliografias como por exemplo, trabalhos de Vidor & Belló (2000); Ferreira & Grattapaglia (1996); Qui & Bouché (1998); Pop et al. (2003). Em seus trabalhos Forbes (2003), realizou testes entre kits comerciais e protocolos laboratoriais para extração de DNA genômico bacteriano.

A extração de DNA de células eucariontes consta fundamentalmente de três etapas: ruptura das células para liberação dos núcleos, desmembramento dos cromossomos em seus componentes básicos, DNA e proteínas e separação do DNA dos demais componentes celulares.

Para extração do DNA de uma amostra, as paredes celulares devem ser rompidas com o objetivo de liberar os constituintes celulares. Essa etapa é realizada geralmente pelo congelamento do tecido vegetal em nitrogênio líquido e posterior quebra mecânica. No presente trabalho esta etapa foi realizada utilizando-se um cadinho de porcelana e um bastão de vidro.

A seguir as membranas celulares devem ser rompidas para liberação do DNA. Essa etapa é realizada pela ação de um detergente como SDS (dodecil sulfato de sódio) ou CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), variando para diferentes protocolos, no presente trabalhos foram testados os dois reagentes para extração.

Para evitar a ação de DNAses, que podem degradar o DNA, os tampões de extração possuem pH por volta de 8,0, enquanto o pH ótimo para ação de DNAses endógenas fica por volta de 7,0, ou a adição de EDTA (ácido etileno diamono tetracético) no tampão de extração. O EDTA é uma substância quelante de cátions divalentes, como Mg^{+2} e Ca^{+2} e, portanto, inibe a ação de DNAses, que usam esses metais como cofatores (Sambrook et al., 1989). No presente trabalho o tampão de extração foi testado com pH 8,0.

Na seqüência os ácidos nucléicos devem ser separados das proteínas. São realizadas uma a várias extrações com fenol e/ou clorofórmio, de acordo com o material em estudo, que desnaturam as proteínas tornando-as insolúveis à fase aquosa, onde se encontram os ácidos nucléicos.

O DNA deve ser protegido da ação de compostos fenólicos, que oxidam o DNA irreversivelmente, tornando este inacessível às enzimas de restrição. A contaminação por compostos fenólicos pode ser evidenciada pela coloração do DNA que tende a ficar marrom. Para evitar o efeito oxidativo dos polifenóis, deve ser adicionado ao tampão de extração agentes anti-oxidantes, como PVP (polivinilpirrolidona), BSA (albumina de soro bovino) ou b-mercaptoetanol.

Na etapa seguinte os ácidos nucléicos devem ser separados de polissacarídeos, pois estes inibem a ação de enzimas de restrição e tornam a amostra de DNA excessivamente viscosa, interferindo na migração do DNA em corridas eletroforéticas. Em alguns protocolos o detergente CTAB é utilizado com essa finalidade, já que polissacarídeos e ácidos nucléicos possuem solubilidade diferenciada na presença desse detergente. Outros protocolos utilizam a remoção de polissacarídeos pelo emprego de gradiente de cloreto de céσιο (CsCl). No presente trabalho não foi testada a remoção de polissacarídeos utilizando este reagente.

A maioria dos protocolos descritos na literatura utilizam o protocolo CTAB padrão, com algumas modificações, com vistas a resolver problemas específicos da espécie em estudo.

Foram testadas separadamente diferentes reagentes em diferentes condições de tempo, velocidade e temperatura de centrifugação. Após a obtenção de dados satisfatórios em relação a procedimentos e reagentes, chegou-se a uma metodologia, abaixo descrita.

Após a aplicação dos protocolos testados, as amostras de DNA extraído foram mantidas a -20°C , até a visualização em gel. O DNA extraído nas amostras em estudo foi visualizado em gel de agarose 1,2%, usando-se procedimento com base nas recomendações de Sambroock et al. (1987).

3.3 Resultados e Discussão

O protocolo que foi eficiente na extração de DNA de oligoquetas foi o descrito a seguir:

- Macerar com nitrogênio líquido, 10 g de material previamente limpo; para isso, adicionar o buffer de extração CTAB (2%) (detergente catiônico) até o material apresentar consistência líquida;
- Colocar 600 μl do material macerado em um tubo Eppendorf esterilizado;

- Incubar o material a 65°C por 20 min;
- Adicionar 400µl de clorofórmio: álcool isoamyl (24:1);
- Misturar em misturador a 62 rpm por 15 minutos;
- Centrifugar a 13000 rpm por 8 min;
- Transferir a parte aquosa contendo o DNA para um tubo eppendorf estéril;
- Adicionar 400µl de Isopropanol;
- Misturar e manter a temperatura ambiente por 5 min;
- Centrifugar a 13000 rpm por 8 min;
- Descartar o sobrenadante;
- Inverter o tubo para secar o pellet;
- Adicionar 100µl de etanol 100% gelado, misturando com cuidado;
- Deixar a temperatura ambiente por 5 min;
- Centrifugar a 13000 rpm por 8 min;
- Descartar o etanol;
- Ressuspender o pellet com 100µl de água MILIQ gelada.

Os resultados da validade do protocolo utilizado para extração de DNA de *Eisenia foetida* e *Pheretima* sp. Podem ser visualizados na Figura 2, onde se observa quatro extrações de DNA, extraído com o uso do protocolo proposto.

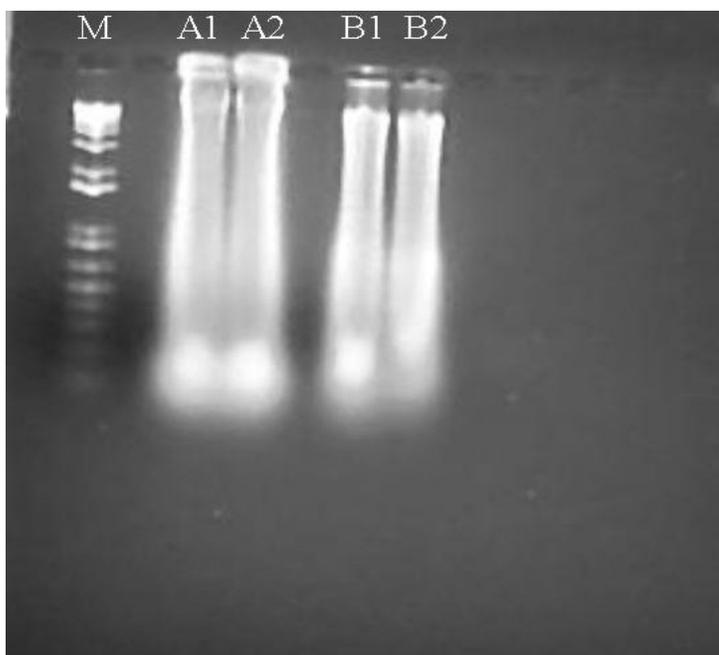


Figura 2 - DNA genômico de *Eisenia foetida* (A1, A2) e *Pheretima* sp. (B1, B2), Marcador molecular Gibco 1 Kb (M).

Embora seja um primeiro passo na tentativa de estabelecer um protocolo para extração de DNA, que seja eficiente, rápido e de baixo custo, é importante salientar, que com a quantidade de DNA extraído usando-se o protocolo proposto, será possível a realização de estudos em identificação com diferentes marcadores moleculares, variabilidade e caracterização genética, estudos sobre o efeito de produtos químicos sobre as oligoquetas disponíveis em áreas contaminadas.

3.4 Conclusão

O protocolo proposto no presente trabalho foi eficiente para extração de DNA genômico em oligoquetas dos gêneros *Eisenia foetida* e *Pheretima* sp.

3.5 Referências bibliográficas

ADIS, J.; RIGHI, G., Mass migration and life cycle adaptation -- a survival strategy of terrestrial earthworms in central Amazonian inundation forests. **Amazoniana** **11** 1, pp. 23-30. 1989.

ANDRÉN, O., PAUSTIAN, K.; ROSSWALL, T., Soil biotic interactions in the functioning of agro ecosystems. **Agriculture Ecosystems Environment**. **24**, 57-67. Academic Press, 1996. 2.ed. p.194-195. 1988.

ATLAS, R.M.; HOROWITZ, A.; KRICHEVSKY, M.; BEJ, A.K. Responses of microbial populations to environmental disturbance. **Microbial Ecology**, v.22, p.249-256, 1991.

ANTONIOLLI, Z.I.; GIRACCA, E.M.N.; BARCELLOS, L.A. VENTURINI S.F.; VENTURINI E.F.; WIETHAN, M.A.; CARLOSSO, S.J.T.; BENEDETTI, T.; SENHOR, T.C.; SANTI, G.R. Minhocultura e Vermicompostagem, **Boletim Técnico** n.3. Depto de Solos, UFSM. Santa Maria, 2002.

BAROIS, I., BROSSARD, M., LAVELLE, P., TONDOH, J., KANYONYO, J., MARTÍNEZ, A., JIMÉNEZ, J., ROSSI, J., ANGELES, A., LATTAUD, C., SENAPATI, B., FRAGOS, C., BLANCHART, E., BROWN, G. AND MORENO, A. Ecology of earthworm species with large environmental tolerance and/or extended distributions. In: **Earthworm management in tropical agro ecosystems**. P. Lavelle, Hendrix, P. y L. Brussaard (ed). CAB International London. 57-86. 1999.

BROWN, G. G., BAROIS, I.; P. Lavelle. Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role interactions with other edaphic functional domains. **European Journal of Soil Biology**. 36:1-23. 2000.

BOUCHÉ, M.B. **Lombriciens de France Écologie et systematique**. INRA Publ. Ann. Zool. Ecol. Anim. (no hors-serie), 72(2). 671p. 1972

BOUCHÉ, M.B. Stratégies lombriciennes. In: Lohm, U., PERSSON, T., (Eds.), **Soil Organisms as Components of Ecosystems**. Ecological Bulletins, Stockholm, 1977. p. 22-132

BUCKERFIELD, J.C., LEE, K.E., DAVOREN, C.W. AND HANNAY, J.N., Earthworms as indicators of sustainable production in dryland cropping in southern Australia. **Soil Biol. Biochem.** **29** 3,4, pp. 547-554. 1997.

CHAUVEL, A., GRIMALDI, M., BARROS, E., BLANCHART, E., DESJARDINS, T., SARRAZIN, M.; LAVELLE, P., Pasture damage by an Amazonian earthworm. **Nature** **398**, pp. 32-33. 1999.

DECAËNS, T., LAVELLE, P., JIMÉNEZ, J.J., ESCOBAR, G. AND RIPPSTEIN, G., Impact of land management on soil macrofauna in the Oriental Llanos of Colombia. **Eur. J. Soil Biol.** **30**, pp. 157-168 1994.

DOMÍNGUEZ, J., EDWARDS, C.A., WEBSTER, M., Vermicomposting of sewage sludge: effect of bulking materials on the growth and reproduction of the earthworm *Eisenia andrei*. **Pedobiologia** **44**, 24-32. 2000.

EDWARDS, C.A. AND BOHLEN, P.J., The effects of toxic chemicals on earthworms. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.** **125**, pp. 23-99. 1992.

EDWARDS, C. A. **Earthworm Ecology**. Ed. St. Louis, 389p. 1998.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3^a ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 200p. (EMBRAPA-CENARGEN **Documento 20**). 1998.

FERRUZZI, CARLO. **Manual de Minhocultura**. Editora Litexa, 165p. 1989.

FORBES, B. A.. Introducing a molecular test into the clinical microbiology laboratory – development, evaluation, and validation. **Arch Pathol Lab Med**;127:1106 -1111. 2003.

GIRAFFA G, ROSSETI L, NEVIANI E. An evaluation of chelex-based DNA purification protocols for the typing of lactic acid bacteria. **Journal of Microbiology Methods** **42**:175-184. 2000.

GALAY-BURGOS M, SPURGEON DJ, WEEKS JM, STURZENBAUM SR, MORGAN AJ, KILLE P. Developing a new method for soil pollution monitoring using molecular genetic biomarkers. **Biomarkers**. May-Aug;8(3-4):229-39. 2003.

GILLER, K.E., BEARE M. H., LAVELLE, P., IZAC P. N., & SWIFT M.J. , Earthworms as bioindicators of cultivated soils? Ecological Bulletins - **Swedish Natural Science Research Council**. Volume 39, p. 45-47. 1998.

HIGGINS JA, JENKINS MC, SHELTON DR, FAYER R, KARNS JS. Rapid extraction of DNA from *Escherichia coli* and *Cryptosporidium parvum* for use in PCR. **Applied and Environment Microbiology**;67:5321-5324. 2001.

HILLIS, D. M., ALLARD, M. W.; MIRYAMOTO, M. M. Analysis of DNA sequence data: Phylogenetic inference. **Methods Enzymology**, p. 224-456, 1993.

JAMES, S. Earthworms and Earth History. In: **Earthworm Ecology** CRC Press, Boca Raton, p. 3-14, 1998

JAMIELSON, B.G.M., On the phylogeny and higher classification of the Oligochaeta. **Cladistics** 4, pp. 367-401. 1988.

KALIA A, RATTAN A, CHOPRA P. A method for extraction of high-quality and high-quantity genomic DNA generally applicable to pathogenic bacteria. **Analytical Biochem**,275:1-5. 1999.

KANEKO, T.; ATLAS, R.M.; KRICHEVSKY, M. Diversity of bacterial populations in the Beaufort Sea. **Nature**, v.270, p.596-599, 1977.

KNAPPER, C.F.U. , FREITAS A.R. , FARIA, S.L.U. Considerações preliminares sobre alguns comportamentos de oligoquetas terrestres , no Rio Grande do Sul (Brasil-I). **Estudos Leopoldenses**, v.26 n115 p.13-32. 1990.

KNAPPER, C.F.U. Considerações preliminares sobre a sistematização de alguns oligoquetas terrestres , reestruturadores e refertilizadores, segundo Gates(1972) Stephenson (1930), Zicsi(1965). **Estudos Leopoldenses**, v.26 n115 p.5-12. 1990.

LEE, K.E., 1985. Earthworms. **Their Ecology and Relationships with soils and Land Use**. Academic Press, Sydney, 411 pp. 1985.

MCORIST AL, JACKSON M, BIRD AR. A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples. **J Microbiol Methods** 50:131-139. 2002.

MORGAN, J.E.; MORGAN, A.J., Heavy metal concentrations in the tissues, ingesta, ingesta and faeces of physiologically different earthworm species. **Soil Biol. Biochem.** 24 12, pp. 1691-1697. 1992.

OECD Guideline for testing of chemicals no. 207. **Earthworm, acute toxicity tests.** OECD, Paris, France. 1984.

OMLAND, K. E. Caracteres congruence between a molecular and a morphological phylogeny for dabbling ducks. **Syst. Biol.** N 43, v.3, p. 369-387, 1994.

OMODEO, P. Contributo alla revisione dei lumbricidae. **Archivio Zoologico Italiano**, 41:129-212.

OLIVEIRA, C. M., FUNGARO, M. H.P., CAMARGO, L. E.A. *et al.* Comparative analysis of the stability of DNA of *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) under different methods of preservation for use in RAPD-PCR. **Neotrop. Entomol.**, Apr./June, vol.31, no.2, p.225-231. ISSN 1519-566X. 2002.

PEIXOTO, R.T.G. **Compostagem opção para o Manejo Orgânico do Solo.** Fundação Instituto Agrônômico do Paraná, Londrina. 1988. 48p.

POP, A. A . ; Wink M. & POP, V. Use of 18S, 16S rDNA and cytochrome c oxidase sequences in earthworm taxonomy (Oligochaeta, Lumbricidae). **Pedobiologia.** 47, 428-433. 2003.

QUI, J.P. & BOUCHÉ, M.B. Revision des taxons supraspécifiques de Lumbricoidea. **Doc. Pedozoologiques et Integrologiques**, Montpellier, 3:179-216. 1998.

REINECKE, A.J. & VILJOEN, S.A. A comparison of the biology of *Eisenia foetida* and *Eisenia Andrei* (Oligochaeta). **Biol. Fertil. Soils**, 11:295-300, 1991.

RIGHI, G. **Oligochaeta:** manual de identificação de invertebrados limnicos do Brasil. Brasília: CNPq/Coordenação. Editorial 1984. 47p.

SANGER, F. S. NICKLEN, S. ; COULSON, A. R. DNA sequencing with with chain-terminating inhibitors. **Proceedings Natural Academic Science**, n.74, 5463-5467, 1977.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: A Laboratory Manual.** 2nd ed. 1987.

STORER, T. I.; USINGER, R. L. **Zoologia Geral**. São Paulo, Companhia Editora Nacional, USP, 1971, 757p.

TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F.L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p.782-787, 1990.

VIDOR, M.A. & BELÓ, A. protocolo para extração de DNA de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: CONGRESSO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 2000, Evora, Portugal. Anais.. Evora, Portugal: Universidade de Evora, 2000.

WALSH, P.; EL ADLOUNI, C.; NADEAU, D.; FOURNIER, M.; CODERRE, D.; POIRIER, G. G. DNA adducts in earthworms exposed to a contaminated soil. **Soil Biochemistry**, v. 29, n. 3/4, 721-724, 1997.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados alcançados nesta pesquisa em conformidade com o estado atual do conhecimento, em sistema de plantio direto avaliando mesofauna e bactérias nitrificadoras do solo permitem algumas sugestões à continuidade do estudo:

- a) Selecionar grupo ou espécie de organismos da mesofauna edáfica como bioindicadores das características de uso do solo, como por exemplo o grupo Collembola..
- b) Avaliar o potencial das bactérias nitrificadoras em diferentes rotações de culturas e sistemas de manejo de solos, aprofundando estudos sobre sua ocorrência e relação com outros fatores químicos, físicos e biológicos.
- c) Associar estudos de dinâmica de nitrogênio com ocorrência de bactérias nitrificadoras nos solos, relacionando com as propriedades físicas do solo.
- d) Intensificar o estudo de espécies de oligoquetas nativas, caracterizando estes organismos de modo molecular e morfológico.