

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUÍZ DE QUEIROZ"
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DO SOLO
LSO 400 – BIOLOGIA DO SOLO
2º SEMESTRE 2019

APOSTILA DE AULAS PRÁTICAS

Aluno (a): _____

Professores responsáveis

Fernando Dini Andreote (fdandreo@usp.br)

Rafael L. de F. Vasconcellos (rlfvasc@usp.br)

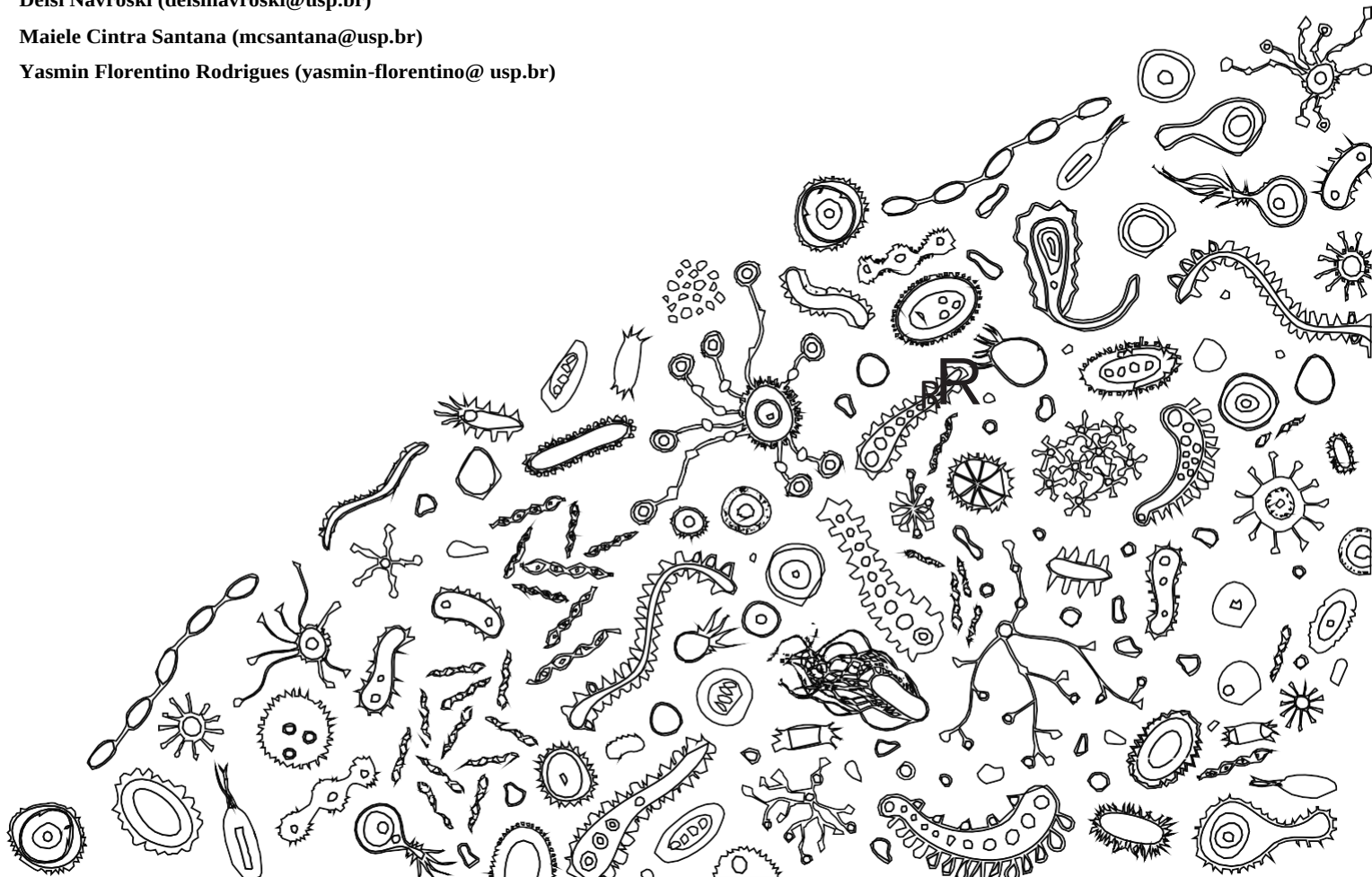
Monitores

Cátia Simon (catiasimonsimon@gmail.com)

Deisi Navroski (deisinavroski@usp.br)

Maiele Cintra Santana (mcsantana@usp.br)

Yasmin Florentino Rodrigues (yasmin-florentino@usp.br)



Piracicaba
2019

LSO-400 – BIOLOGIA DO SOLO
Departamento de Ciência do solo

ISOLAMENTO DE FUNGOS E BACTÉRIAS TOTAIS
--

Ao final desta aula você deve saber:

- *Quais limitações desta técnica? Explique.*
- *Houve maior quantidade de micro-organismos em qual área? Por quê?*
- *Como é o comportamento de crescimento de fungos e bactérias em cada tipo de solo?*

Objetivo do método:

Quantificação total de micro-organismos cultiváveis do solo em meio enriquecido. Observar as características das colônias e diferenciar. Utilizaremos dois diferentes tipos de solos, sendo estes, um solo de dois anos desenvolvido a partir de rejeito de mineração de calcário, cultivado com cana-de-açúcar, denominado de Tecnossolo e um solo Latossolo.

Meio de cultura para bactérias: Meio Ágar nutriente		
Composição		Peso / Volume
Extrato de carne	3,0 g	
Peptona	5,0 g	
Ágar	15,0 g	
Água destilada	1000 mL	
NaCl	10 g	

Meio de cultura para fungos: Meio de Martin		
Composição		Peso / Volume
Água	1000 mL	
Ágar	15 g	
KH ₂ PO ₄	1 g	
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,5g	
Peptona	5 g	
Dextrose	10 g	
Rosa bengala	0,033 g	
*Estreptomicina	0,030 g	

* Adicionar estreptomicina após autoclavagem.

Procedimentos:

- Pesar 10 g de solo de cada área e colocar em 90 mL de solução salina.
- Preparar diluições seriadas em solução salina (NaCl 0,85%) estéril até 10^{-5} , lembrando que a primeira diluição (10 g de solo em 90 mL de solução salina) é considerada como 10^{-1} . A partir desta, realizar as demais diluições (1mL em 9mL de solução salina no tubo).
- Inocular em meio de cultura para **FUNGOS**, 100 µL das diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} .
- Inocular em meio de cultura para **BACTÉRIAS**, 100 µL das diluições 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} .
- Incubar por 7 dias a 28°C.

RESPIROMETRIA

Ao final dessa prática você precisa saber:

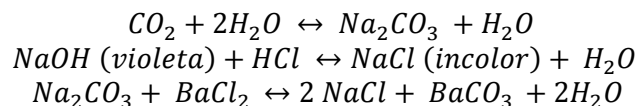
- Para que serve esta análise?
- Quais vantagens e desvantagens deste método?
- Qual o princípio deste método?
- Quais as possíveis inferências que se pode fazer em relação à maior e à menor liberação de CO_2 pela atividade microbiana do solo?

Objetivo do método:

Avaliar a atividade degradativa dos microrganismos por meio da liberação de CO_2 em dois diferentes tipos de solos, sendo estes, um solo de dois anos desenvolvido a partir de rejeito de mineração de calcário, cultivado com cana-de-açúcar, denominado de Tecnossolo e um solo Latossolo.

Princípio do método:

Este método baseia-se na captura do $C-CO_2$ emitido de uma amostra de solo (Figura 1) (ou resíduos orgânicos), em solução de NaOH, sendo a determinação do $C-CO_2$ realizada por meio da titulação com HCl.



Essa determinação pode ser realizada no campo ou em laboratório. Quando realizada no campo, mede-se o C respirado em toda área a partir de varias amostras que está sob uma determinada cobertura vegetal (sistemas agrícolas ou ecossistemas naturais) e em uma determinada época do ano. Quando realizado no laboratório, existe a possibilidade de se trabalhar com amostras deformadas ou indeformadas.



Figura 1. Incubação do solo em recipientes de vidro para avaliação da respiração da microbiota do solo.

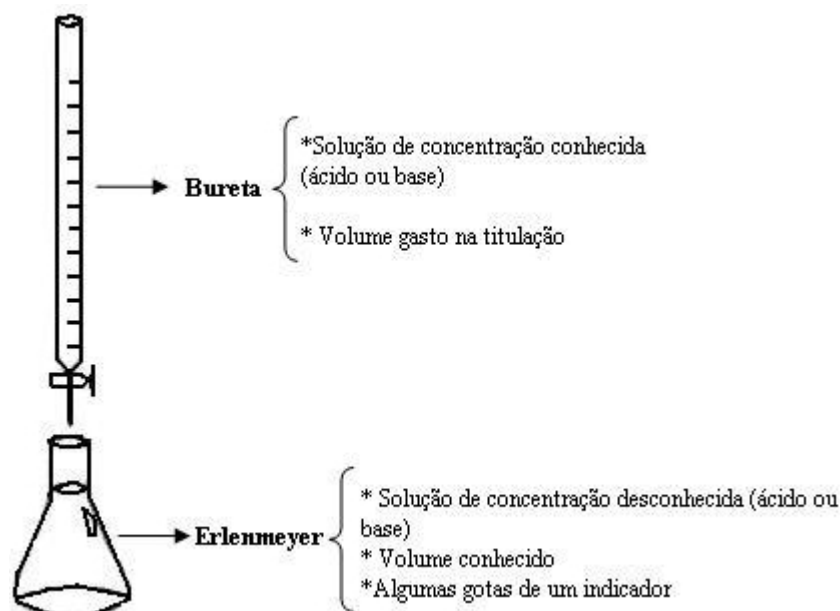


Figura 2. Determinação do C-CO₂ evoluído (respirado) do solo por titulação do NaOH excedente com HCl.

Procedimentos:

- Pesar 100 g de solo úmido e colocar nos frascos de incubação.
- Calcular a quantidade de água destilada necessária para elevar a umidade do solo (T.F.S.A.) até 60% da C.R.A.
- Pesar 0,5g de glicose e 0,5g de bagaço.
- Dissolver a glicose na quantidade de água necessária para corrigir a capacidade de campo.
- Misturar o bagaço uniformemente com os 100g de solo.
- Colocar um frasco contendo 20 mL de NaOH 1N dentro de cada frasco com solo e fechar hermeticamente.
- Preparação de brancos: utilizar um frasco de incubação adicionando apenas água e um frasco com 20mL de NaOH 1N.
- Incubar por 1 semana a 28 °C.

Leitura das amostras:

1. Após 1 semana, abrir os frascos (imediatamente antes da titulação) e adicionar 1 mL da solução BaCl₂ 50%, mais 2 gotas do indicador fenolftaleína aos béqueres contendo NaOH.
2. Titular com HCl 1N até desaparecimento da cor rósea. Anotar o volume do HCl gasto na titulação.
3. Realizar os cálculos de CO₂ liberada por grama de solo seco. Os valores são expressos em µg g. solo⁻¹ dia⁻¹ de CO₂ liberado:

$$\text{mL}(\text{NaOH}) \times \text{N}(\text{NaOH}) - \text{mL}(\text{HCl}) \times \text{N}(\text{HCl}) \times 22 = \text{mg de CO}_2$$

N= concentração em normalidade.

LSO-400 – BIOLOGIA DO SOLO
Departamento de Ciência do solo

1. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA β-GLUCOSIDASE
--

Objetivo do método:

Avaliar a atividade enzimática em dois tipos de solos, sendo estes um solo de dois anos desenvolvido a partir de rejeito de mineração de calcário, cultivado com cana-de-açúcar, denominado de Tecnossolo e um solo Latossolo.

Princípio do método:

Baseia-se na determinação colorimétrica do p-nitrofenol liberado pelas β -glicosidases do solo, quando o solo é incubado com uma solução tamponada de p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo.

Substrato: p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (PNG).

Produto: p-nitrofenol.

Coloração: amarela.

Procedimentos:

- Pesar $1,00\text{g} \pm 0,005\text{ g}$ de solo (livre de resíduos orgânicos/peneirado em peneira de 4 mm) e colocar em um tubo de ensaio.
 - Adicionar 4 mL de MUB pH 6,0.
 - Adicionar 1 mL de PNG 0,025M a todos os frascos menos os controles (testemunha, branco).
 - Agitar os frascos, coloque a rolha de borracha e incube a 37°C por uma hora.
 - Adicionar 1 mL de 0,5M CaCl_2 .
 - Adicionar 4 mL de THAM pH 12.
 - Adicionar 1 mL de PNG nos controles.
 - Agitar os frascos para misturar e filtrar através de um papel de filtro.
 - Faça a leitura da coloração amarela num espectrofotômetro a 410 nm.
- Se for necessário, fazer diluição das amostras em água destilada.

2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA FOSFATASE ÁCIDA

Objetivo do método:

Avaliar a atividade da enzima fosfatase ácida liberada por microrganismos em diferentes tipos de solos.

Princípio do método:

Baseia-se na determinação colorimétrica da p-nitrofenol que é liberado pelas fosfatases encontradas no solo quando o solo é incubado com uma solução tamponada de p-nitrofenol fosfato.

Substrato: p-nitrofenyl fosfato (PNF)

Produto: p-nitrofenol

Coloração: amarela

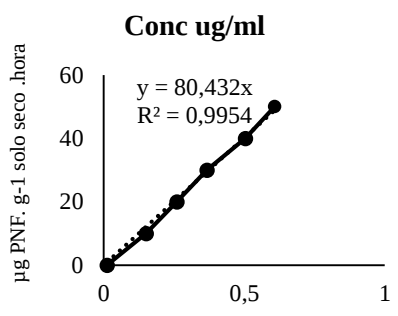
Procedimentos:

- Pesar $1,00\text{g} \pm 0,005\text{ g}$ de solo (livre de resíduos orgânicos/peneirado a 4mm), colocar em um tubo de ensaio.
- Adicionar 4 mL de MUB pH 6,5.
- Adicionar 1 mL de PNF a todos os frascos menos os controles (testemunha, branco).
- Agitar os frascos, coloque a rolha de borracha e incube a 37°C por uma hora.
- Adicionar 1 mL de 0,5M CaCl_2 .
- Adicionar 4 mL de NaOH 0,5M. Adicionar 1 mL de PNF aos controles.
- Agitar os frascos para misturar e filtrar através de um papel de filtro.
- Determinar a intensidade da coloração amarela em um espectrofotômetro a 410 nm.

PROCEDIMENTOS PARA OBTENÇÃO E LEITURA DE DADOS ENZIMÁTICOS

Preparo da curva padrão para as enzimas:

Concentração (ug de p- nitrofenol)	mL de água	mL de solução padrão diluída	CaCl ₂ (mL)	NaOH (mL)	
0	5	0	1	4	
10	4	1	1	4	
20	3	2	1	4	
30	2	3	1	4	
40	1	4	1	4	
50	0	5	1	4	



Como analisar os dados?

<i>Tra.</i>	<i>Valor obtido de absorbância</i>	<i>Equação curva . valor de absorbância</i>	<i>Valor obtido na fórmula anterior - o valor do branco</i>	<i>Valor obtido após a subtração do branco . o valor de diluição</i>	<i>Média</i>
Feijão guandu	0,278	(80,432*0,278)= 22,360	(22,360-0,589)= 21,770	(21,770*10)= 217,703	154,564
Feijão guandu	0,121	(80,432*0,121)= 9,732	(9,732-0,589)= 9,142	(9,142*10)= 91,424	
Feijão guandu	0,199	(80,432*0,199)= 16,046	(16,046-0,589)= 15,456	(15,456*10)= 154,564	
Branco	0,009	(80,432*0,009)= 0,723			0,589
	0,007	(80,432*0,007)= 0,563			
	0,006	(80,432*0,006)= 0,482			
Diluição	3 mL de H ₂ O/0,30 mL do produto = 10 vezes				

Questões de campo:

1. Uma agricultora do MS tem duas propriedades cultivadas com soja precoce NA5900RR, entretanto, as áreas diferem no *tipo de preparo do solo*, sendo uma cultivada convencionalmente e outra pelo sistema de plantio direto. De acordo com seus conhecimentos práticos descreva: Sobre a diferença entre cultivo convencional e sistema de plantio direto.

Para a **biologia do solo**, qual dos dois tipos de manejo do solo é mais indicado? Descreva por que (benefícios para a comunidade microbiana do solo – diversidade, fontes de carbono, fatores físicos e químicos do solo, como isso influencia a comunidade microbiana do solo, etc).

2. Uma agricultora do ES tem duas pequenas áreas de cultivo em sistema de plantio direto, uma com *Urochloa brizantha* e outra com crambe. Sabe-se que a *U. brizantha* é uma gramínea, com raízes fasciculadas e com grande produção de fitomassa vegetal. Já o crambe pertence à família das Brassicaceae, pode apresentar efeito alelopático (inibir o desenvolvimento de plantas e até influenciar na comunidade microbiana do solo), não-micorrízico, tem sistema radicular pivotante, e quando comparado com a *U. brizantha* tem baixa fitomassa vegetal. Esta agricultora contratou uma empresa de microbiologia do solo, para medir a atividade da enzima da fosfatase ácida, e os resultados encontrados foram:

Área com *U. brizantha*, 572,86 (µg PNF. g⁻¹ solo seco.hora);

Área com crambe, 466,14 (µg PNF. g⁻¹ solo seco.hora).

Qual dos dois cultivos mencionados, após a análise enzimática você, como engenheira (o) agrônomo, indicaria para a produtora? Descreva sobre sua resposta (observe todos os parâmetros: disponibilidade fósforo no solo, secreção de fosfatases, morfologia vegetal, etc).

AVALIAÇÃO DE BACTÉRIAS NODULADORAS EM LEGUMINOSAS

Ao final desta aula você deve saber:

- Qual é a vantagem da inoculação de bactérias noduladoras em plantas leguminosas?
- Como avaliar se a inoculação foi bem-sucedida?
- Qual a importância e as principais vantagens do processo de inoculação para a lavoura de soja?
- Quais características divergem os nódulos da ocorrência de nematóides?
- Como avaliar a atividade de nodulação (ativo e não ativo)?

Objetivo da aula:

Avaliar a importância da nodulação e a qualidade da inoculação de leguminosas.

Materiais:

- Sementes de leguminosas (Exemplo: Feijão, Soja, Tremoço).
- Placas de corte dos nódulos de diferentes culturas.
- Microscópio.
- Bisturi.
- Soja em vasos.
- Amostra de raízes infectadas.
- Inoculantes comerciais.
- Pinças e alças de platina.

Procedimentos em aula:

1º Parte: Avaliação do material vivo.

Caracterizar o estado de nodulação da planta de soja plantada em vasos e a viabilidade dos nódulos.

2º Parte: Avaliar as placas de corte dos nódulos.

Observar os diferentes tipos de cortes nos microscópios da bancada.

3º Parte: Analisar o material infectado com nematoides.

Observar a ocorrência de nematoides nas raízes do material amostral infectado.

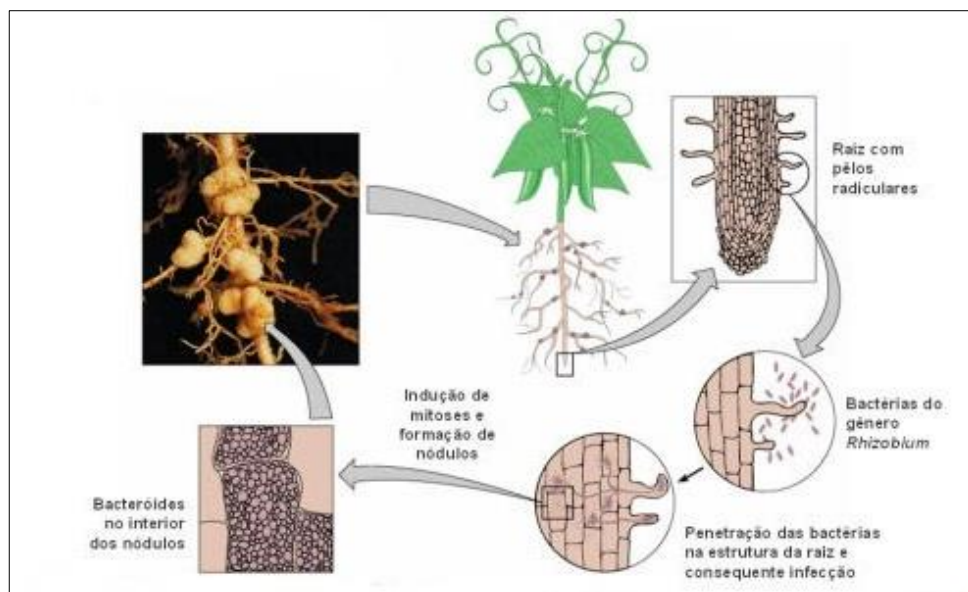


Figura 1. Representação de formação de nodulos. Adaptado: Tortora et al., 2000.

**EXTRAÇÃO DE ESPOROS DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (FMA)
E COLONIZAÇÃO MICORRÍZICA ARBUSCULAR (MA)**

Ao final dessa prática você precisa saber:

- *O que caracteriza a micorriza arbuscular?*
- *Quais vantagens a planta e o fungo têm com a simbiose micorrízica?*
- *Qual estrutura é comumente utilizada para identificar o fungo micorrízico arbuscular e qual a importância de realizar a identificação?*
- *A micorriza arbuscular provoca alterações morfológicas, visíveis a olho nu, nas raízes? Caso sua resposta seja negativa, como deve ser feito para detectar a colonização radicular?*

Objetivo do método:

Extrair esporos de FMA das amostras de solo e avaliar lâminas contendo raízes coradas para identificar as estruturas de MA (hifas, arbúsculos, vesículas).

Procedimentos para extração de esporos de FMA:

- Pesar em um Becker 50 g de amostras de solo, em seguida, adicionar aproximadamente 200mL de água deionizada e homogeneizar a amostra com um bastão para desfazer os torrões;
- Passar o conteúdo quantitativamente em peneiras de malhas 710 mm e 53 mm, nessa sequência (Figura 1);
- Recolher o conteúdo da peneira de menor malha em tubos de centrifuga, em seguida, adicionar a solução de sacarose 70% até cobrir totalmente a amostra e homogeneizar;
- Centrifugar o material a 2000 rpm por 2 minutos;
- O sobrenadante deve ser recolhido na peneira de menor malha, lavado com água destilada e transferido para placa de contagem (placa canaletada). A placa contendo os esporos deve ser observada em microscópio estereoscópico.

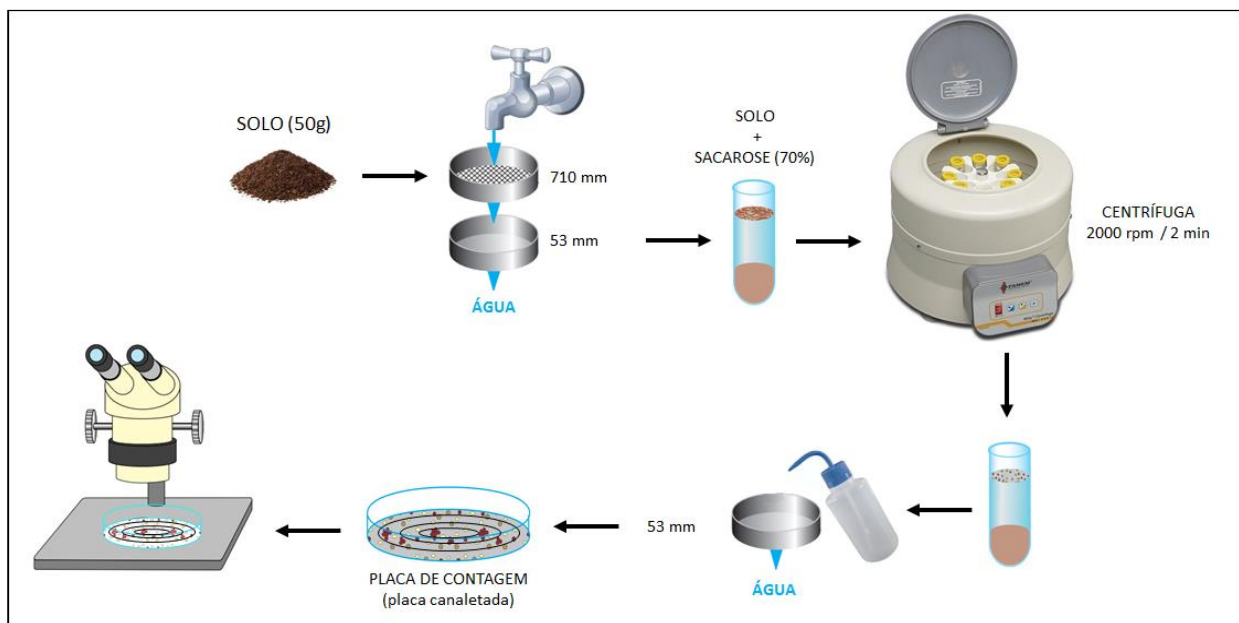


Figura 1. Esquema de extração de esporos de FMA do solo.

**EXTRAÇÃO DE ESPOROS DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (FMA)
E COLONIZAÇÃO MICORRÍZICA ARBUSCULAR (MA)**

Procedimentos para observação da colonização micorrízica arbuscular:

- Lavar de 1 a 2 g de raízes finas em água corrente para retirar o excesso de terra;
- Colocar as raízes em um tubo falcon (50 mL) previamente identificado e adicionar solução de Hidróxido de Potássio (KOH) 10 % até cobrir totalmente a amostra, deixando a mistura em repouso por 24 horas;
- Após este período, ainda no tubo falcon, aquecer a mistura (raízes e KOH 10%) em banho-maria por 50 minutos à temperatura de 90 °C ou até iniciar a fervura (não deixar ferver);
- **Obs.:** O tempo de permanência na solução de KOH 10% pode variar entre espécies de planta, em função das características das raízes (as mais escuras e fibrosas demandam maior tempo para clarificação). Recomenda-se também, para as raízes mais escuras, adicionar Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) a 10%, logo que a mistura (raízes e KOH 10%) é retirada do banho-maria e mexer até que as raízes fiquem de coloração clara.
- Uma vez clarificadas, lavar as raízes com água várias vezes antes de seguir para a etapa de coloração;
- Para coloração, as raízes devem ser colocadas em um tubo falcon novamente e imersas com a solução de tinta de caneta a 5%, em seguida aquecidas em banho-maria por 1 minuto à 90°C;
- Após a coloração, as raízes devem ser retiradas da solução de coloração, lavadas com água e podem ser preservadas em solução de ácido láctico + glicerina + água (1:1:1), permanecendo até o momento da avaliação.

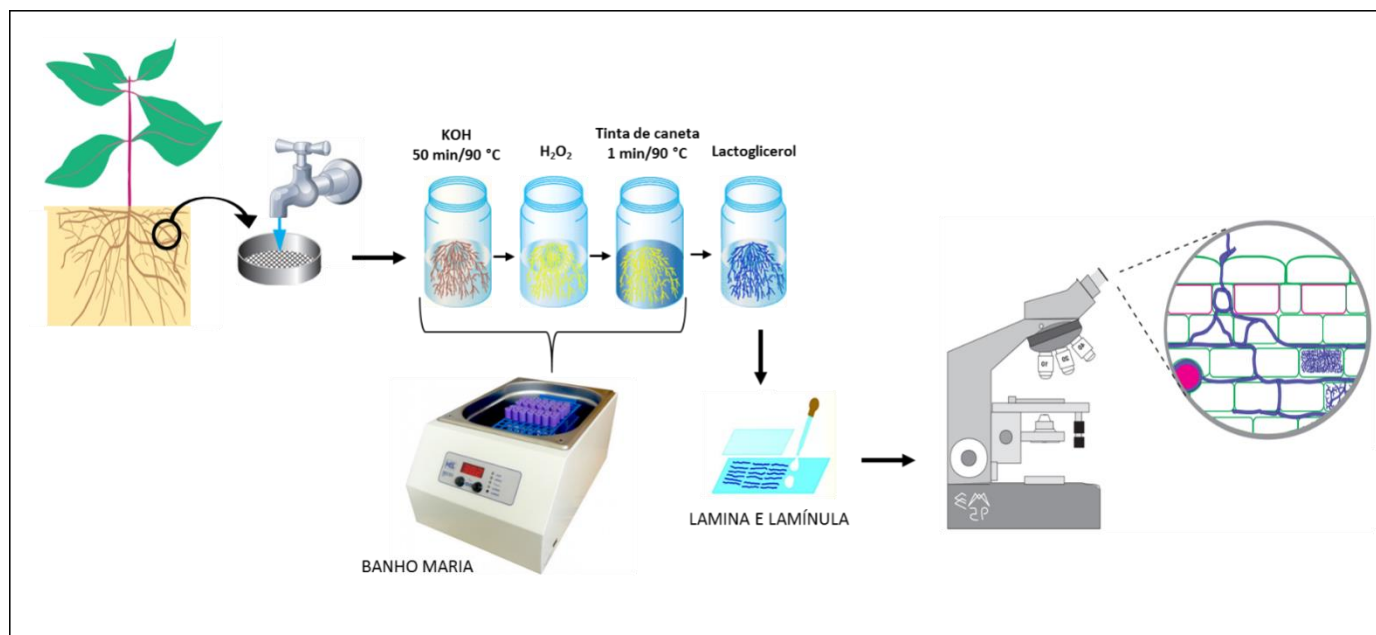


Figura 2. Esquema de coloração de raiz para observação das estruturas da micorriza arbuscular.