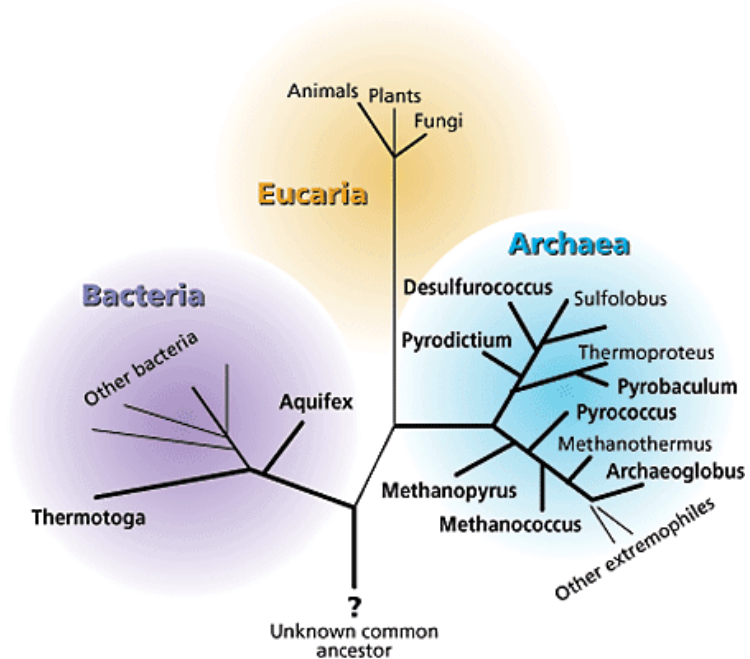
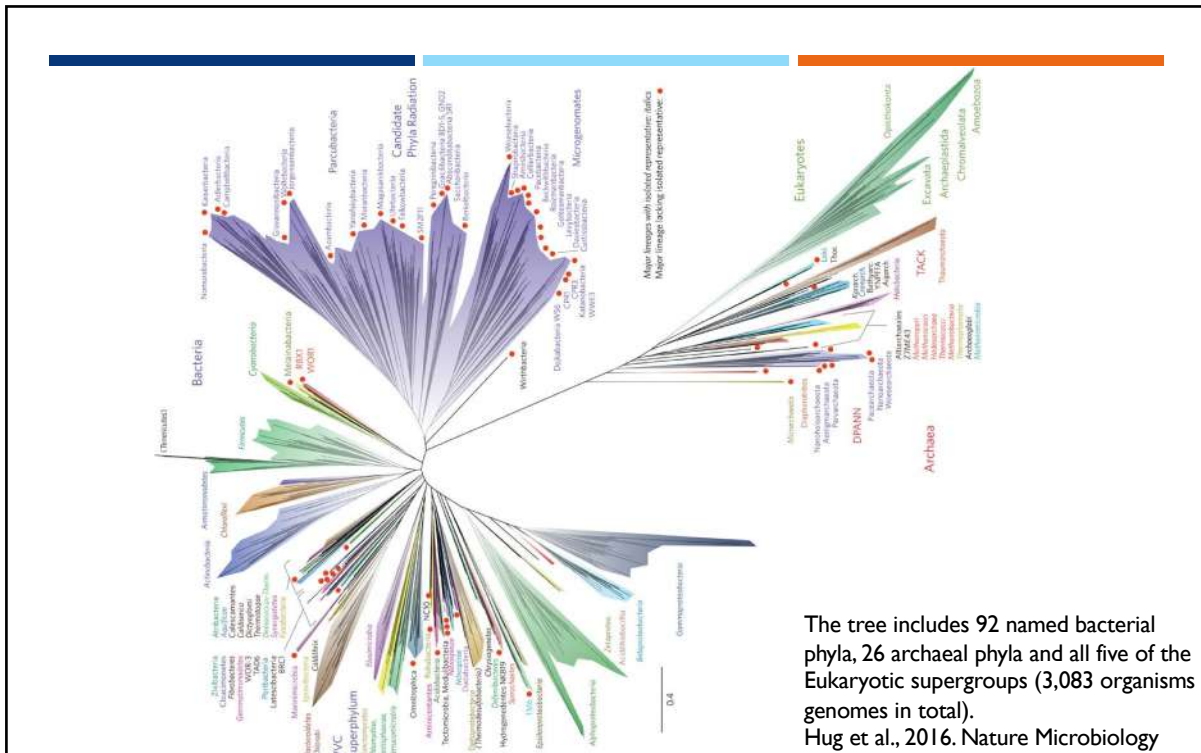


INTRODUÇÃO AOS MÉTODOS INDEPENDENTES DE CULTIVO

FERNANDO DINI ANDREOTE

Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
Universidade de São Paulo
Departamento de Ciência do Solo





ANÁLISES MICROBIANAS

- ✓ *Análises tradicionais de cultivo, gerais e seletivos*
- ✓ *Quantificações no solo*
 - ✓ *Biomassa, respiração, enzimas*
- ✓ *Análises na planta*
 - ✓ *Nodulação*
 - ✓ *Micorrização*
- ✓ *Análises moleculares (quantificação, sequenciamento)*



MÉTODOS DE CULTIVO MICROBIANO

Meios de cultivo não seletivos

- ✓ Fungos
- ✓ Bactérias

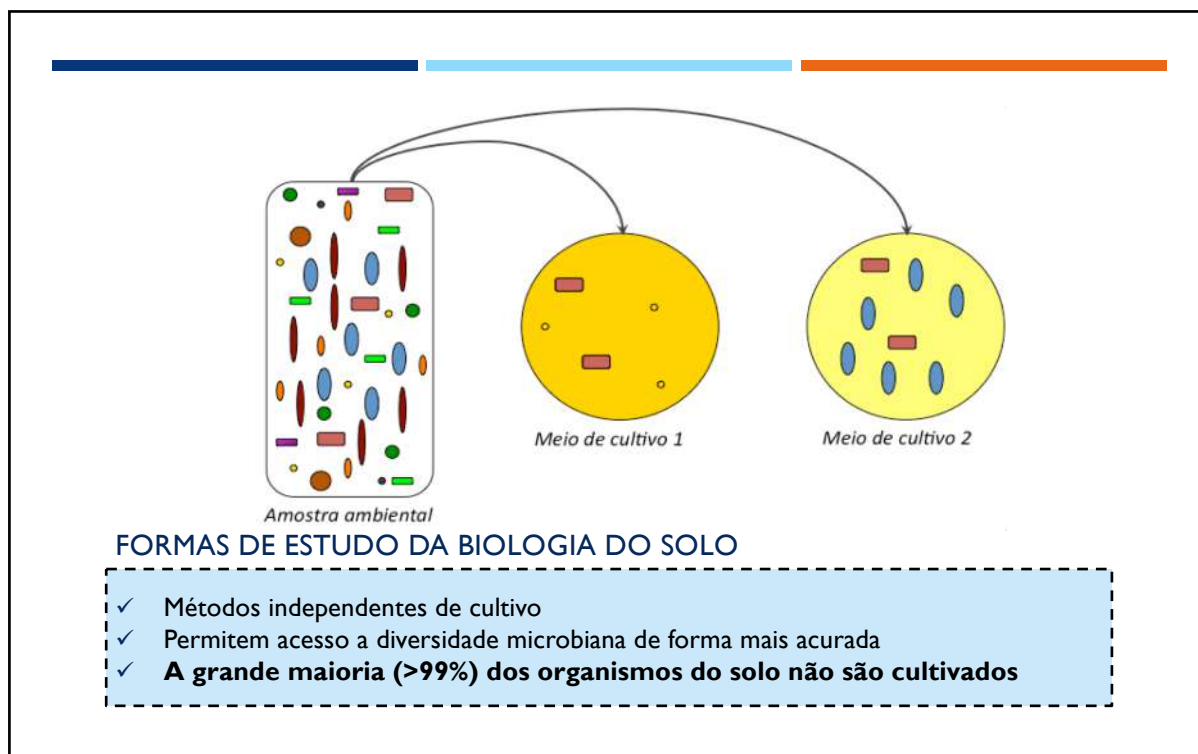
Meios de cultivo específicos

- ✓ Bactérias específicas
- ✓ Fungos específicos
- ✓ Ampla uso clínico e fitopatológico

Meios de cultivo seletivos

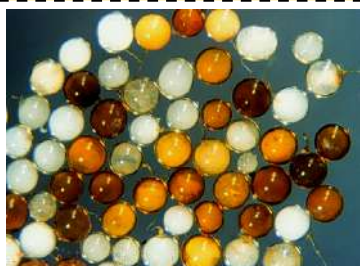
- ✓ Fixadores de N
- ✓ Solubilizadores de P
- ✓ Produtores de enzimas



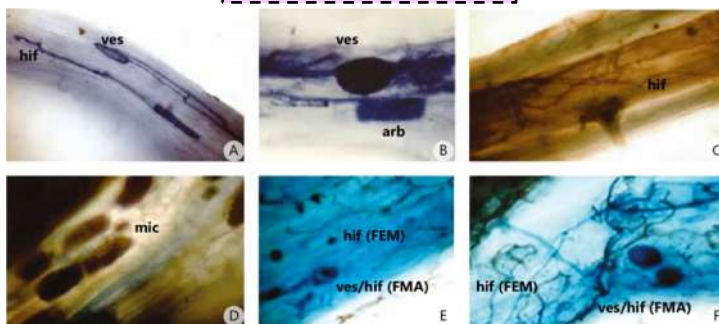


MICORRIZAÇÃO

Quantificação e diversidade de esporos



Colonização de raízes



QUANTIFICAÇÕES NO SOLO – BIOMASSA (C, N, P)

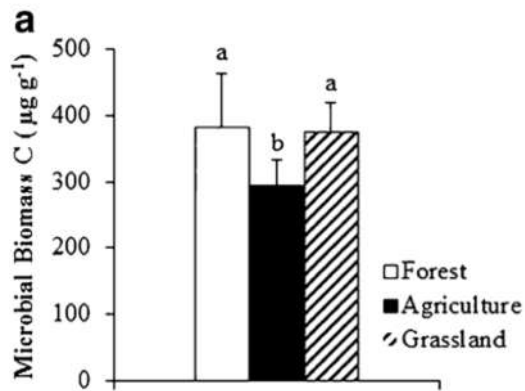
- ✓ Quantificação de biomassa
- ✓ Componente do complexo da MOS
- ✓ Determinação dos principais constituintes
 - ✓ *Carbono*
 - ✓ *Nitrogênio*
 - ✓ *Fósforo*



QUANTIFICAÇÕES NO SOLO - RESPIROMETRIA

- ✓ Indicador de atividade metabólica
- ✓ Foco nos aeróbios
- ✓ Indicadora de atividade/toxicidade/estresse
 - ✓ *Respiração basal*
 - ✓ *Respiração induzida*
 - ✓ *Quociente metabólico*





Kara O., Baykara M. Changes in soil microbial biomass and aggregate stability under different land uses in the northeastern Turkey. Environmental Monitoring and Assessment. 2014, vol. 186, n. 6, pp. 3801-3808.

Sistema	Profundidade (cm)		
	0-10	10-20	20-40
Respiração basal, µg CO ₂ g ⁻¹ h ⁻¹			
CER	19,41	24,78	25,64
PAS	17,97	10,89	20,87
PD1	12,83	11,89	17,96
PD2	21,20	26,55	22,35
PC1	18,25	19,73	27,74
PC2	17,99	35,06	44,26
Média	17,94 a	21,48 a	26,47 a
qCO ₂ , µg CO ₂ µg Cmic ⁻¹ dia ⁻¹			
CER	0,36	1,06	1,09
PAS	0,72	0,59	1,62
PD1	0,58	0,91	1,23
PD2	1,76	2,13	1,88
PC1	2,14	2,31	4,81
PC2	1,48	2,97	3,22
Média	1,17 b	1,66 ab	2,31 a

D'ANDREA, A. F. et al. Atributos biológicos indicadores da qualidade do solo em sistemas de manejo na região do cerrado no sul do estado de Goiás. Rev. Bras. Ciênc. Solo, 2002, vol.26, n.4, pp.913-923.

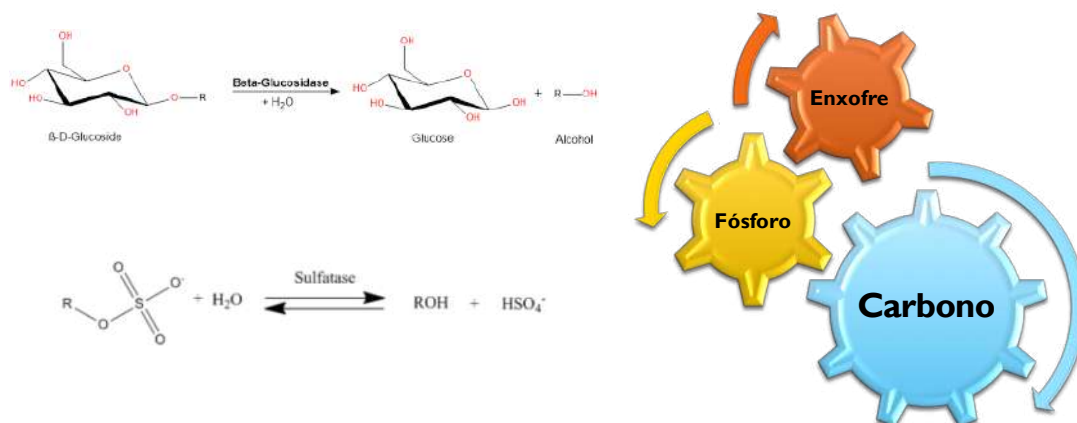
QUANTIFICAÇÕES NO SOLO - ENZIMAS

- ✓ Enzimas com atividade extracelular
- ✓ Atividade sobre ciclagem de nutrientes
- ✓ Atuantes na decomposição de resíduos
 - ✓ Celulases
 - ✓ Fosfatases
 - ✓ Sulfatases
 - ✓ Urease



Estas enzimas não estão diretamente relacionadas com o desenvolvimento vegetal

QUANTIFICAÇÕES NO SOLO - ENZIMAS



Estas enzimas não estão diretamente relacionadas com o desenvolvimento vegetal

QUANTIFICAÇÕES NO SOLO – ENZIMAS DO SISTEMA EMBRAPA BIOAS

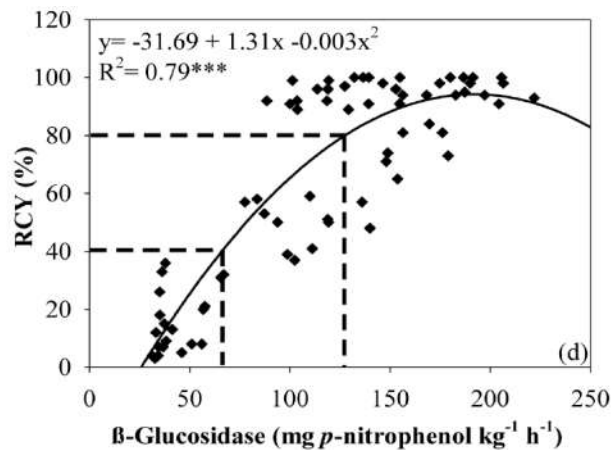
- ✓ Arilsulfatase
- ✓ Beta-glicosidase

Table 3. Pearson's correlation coefficients for the relationships between soil attributes and the relative cumulative yield (RCY), soil organic C (SOC) content, and Mehlich-extractable P in the 24 selected treatments. All coefficients were significant at $P < 0.001$.

Soil attribute	RCY	SOC	Mehlich P
SOC	0.92	–	–
Mehlich-P	0.72	0.63	–
Microbial biomass C	0.76	0.74	0.46
Basal respiration	0.87	0.83	0.57
Cellulase	0.77	0.80	0.47
β -Glucosidase	0.84	0.85	0.59
Acid phosphatase	0.74	0.79	0.55
Arylsulfatase	0.82	0.87	0.65

QUANTIFICAÇÕES NO SOLO – ENZIMAS DO SISTEMA EMBRAPA BIOAS

- ✓ Arilsulfatase
- ✓ Beta-glicosidase



QUANTIFICAÇÕES NO SOLO – ENZIMAS DO SISTEMA EMBRAPA BIOAS

Table 5. Interpretative classes for microbial indicators in a clayey Red Latosol of the Cerrado region (0- to 10-cm depth) as a function of the soil organic C (SOC) content.

Microbial indicator	Interpretative classes as a function of SOC†		
	Low	Moderate	Adequate
Microbial biomass C, mg C kg ⁻¹ soil	≤205	206–405	>405
Basal respiration, mg C kg ⁻¹ soil	≤40	41–100	>100
Cellulase, mg glucose kg ⁻¹ soil d ⁻¹	≤70	71–115	>115
β-Glucosidase, mg <i>p</i> -nitrophenol kg ⁻¹ soil h ⁻¹	≤60	61–140	>140
Acid phosphatase, mg <i>p</i> -nitrophenol kg ⁻¹ soil h ⁻¹	≤640	641–1150	>1150
Arylsulfatase, mg <i>p</i> -nitrophenol kg ⁻¹ soil h ⁻¹	≤35	36–90	>90

† Interpretative classes for SOC are: ≤15.2 g kg⁻¹: low; 15.3–18.2 g kg⁻¹: moderate; and >18.2 g kg⁻¹: adequate.

QUANTIFICAÇÕES NO SOLO – ENZIMAS DO SISTEMA EMBRAPA BIOAS

Tabela 5. Classes de interpretação de bioindicadores para Latossolos Vermelhos argilosos de cerrado, sob cultivos anuais em plantio direto, na camada de 0 cm a 10 cm, específica para amostras de solo coletadas no período chuvoso.

Bioindicador ¹	Classe de interpretação		
	Baixo	Moderado	Adequado
CBM	≤ 245	246-440	> 440
β-Glicosidase	≤ 90	91-225	> 225
Sulfatase	≤ 25	26-145	> 145
Fosfatase Ácida	≤ 700	701-1.260	> 1.260

¹ Valores de CBM expressos em mg de C/kg de solo, valores de atividade de β-glicosidase, fosfatase ácida e arilsulfatase expressos em mg de p-nitrofenol/kg de solo/h.

Fonte: Adaptado de Lopes et al. (2018).

Tabela 6. Classes de interpretação de bioindicadores para Latossolos Vermelhos argilosos de cerrado, sob cultivos anuais em plantio convencional, na camada de 0 cm a 10 cm, específica para amostras de solo coletadas na fase de floração.

Bioindicador ¹	Classe de interpretação		
	Baixo	Moderado	Adequado
CBM	≤ 235	236-375	> 375
β-Glicosidase	≤ 100	101-185	> 185
Sulfatase	≤ 45	46-105	> 105
Fosfatase Ácida	≤ 660	661-940	> 940

¹ Valores de C da biomassa microbiana expressos em mg de C/kg de solo; valores de atividade de β-glicosidase, fosfatase ácida e arilsulfatase expressos em mg de p-nitrofenol/kg de solo/h.

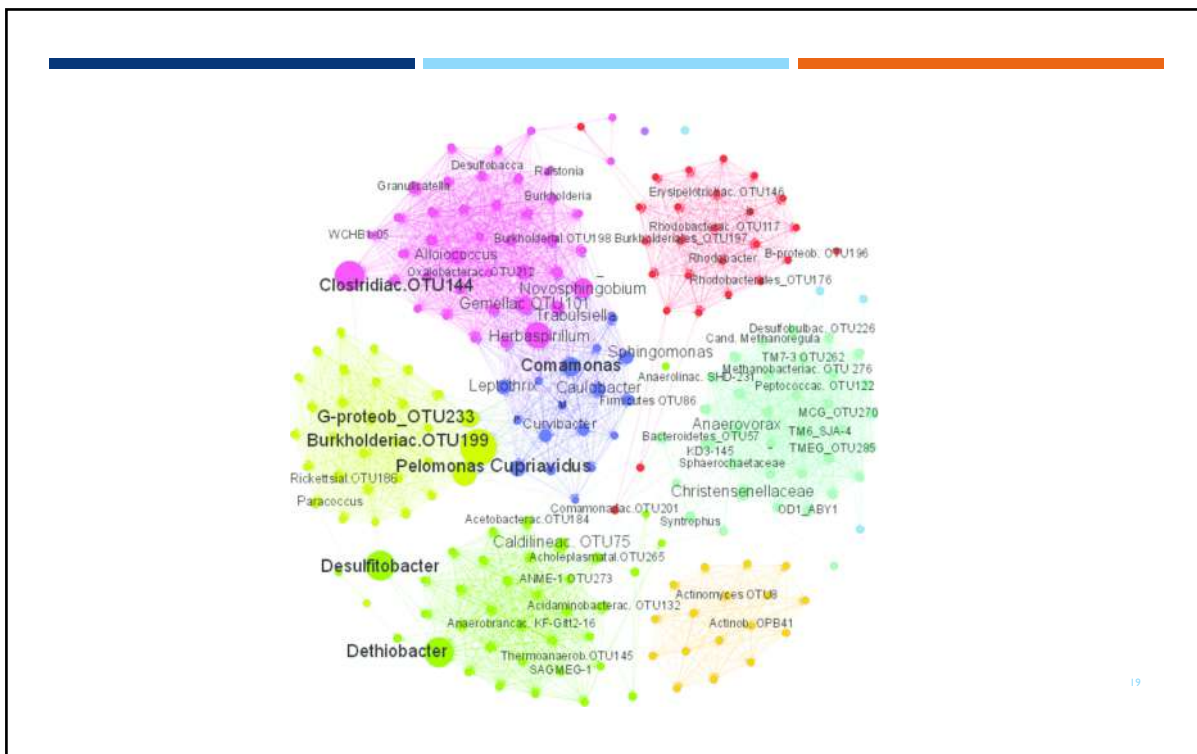
Fonte: Adaptado de Lopes et al. (2018).

ANÁLISES MOLECULARES – BASEADAS EM DNA E/OU RNA DO SOLO

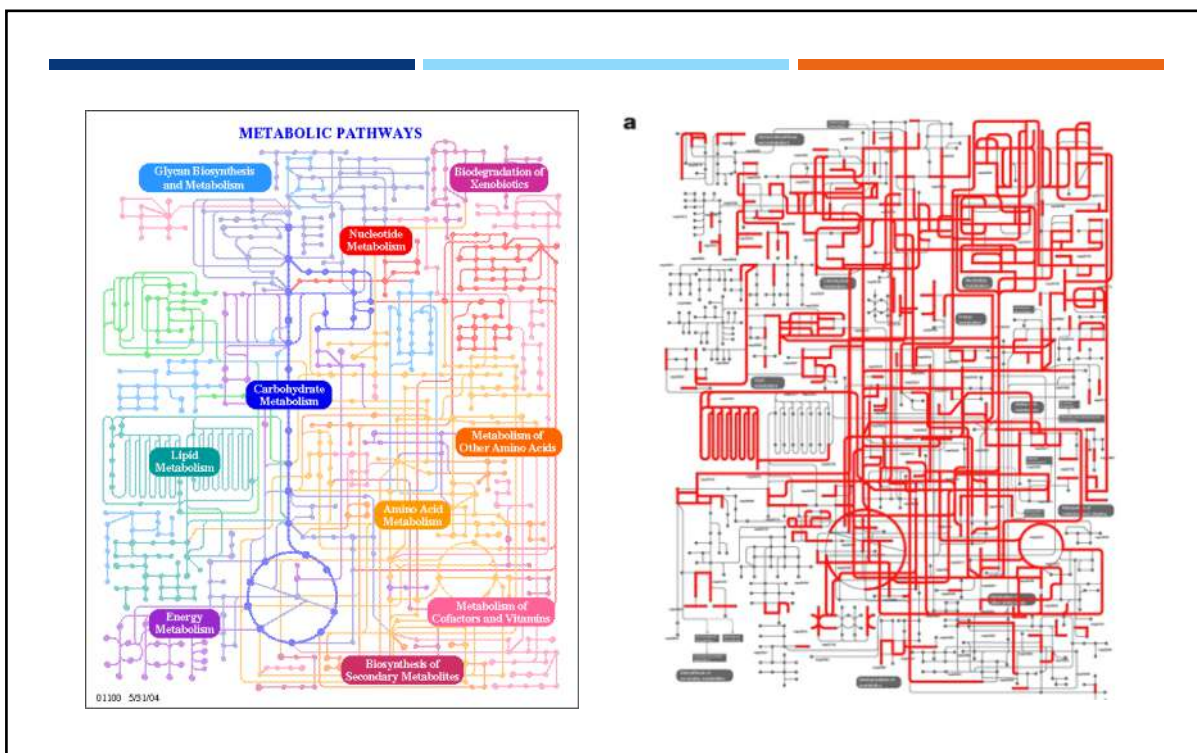
- ✓ Quantificação microbiana (geral e específica)
- ✓ Sequenciamento de genes marcadores
 - ✓ Identificação
 - ✓ Estrutura de comunidades
 - ✓ Correlações
- ✓ Metagenoma
 - ✓ Identificação
 - ✓ Determinação de rotas metabólicas



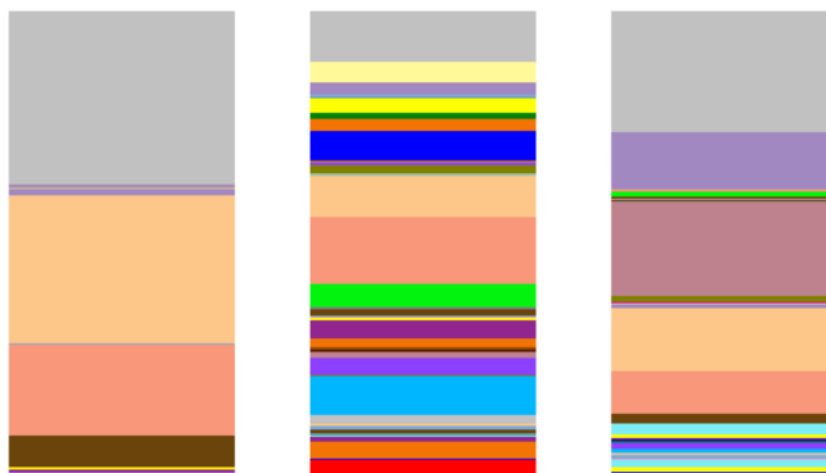
© LEV DOLGACHOV
E5V 02403200 - eayfotostock



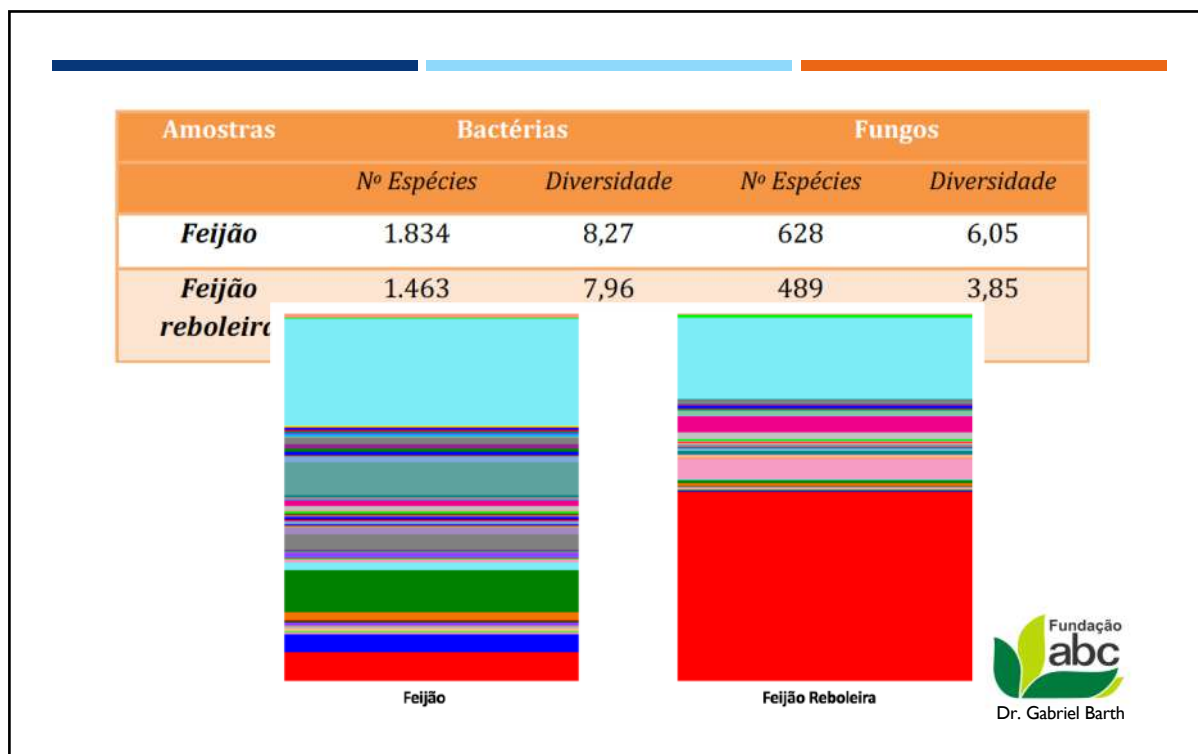
19



EXEMPLOS PRÁTICOS



Amostras	Arilsulfatase $\mu\text{g PNS. g}^{-1} \text{ solo. hora}^{-1}$	Fosfatase ácida $\mu\text{g PNF. g}^{-1} \text{ solo. hora}^{-1}$	Beta-glicosidase $\mu\text{g PNG. g}^{-1} \text{ solo. hora}^{-1}$
Milho	84,5	272,7	85,7
Milho reboleira	60,0	260,6	59,2
Feijão	113,5	449,6	73,2
Feijão reboleira	56,8	270,3	53,1



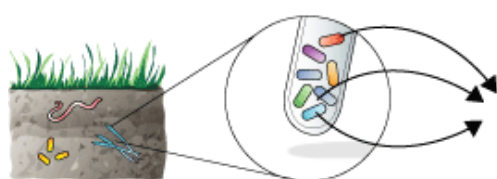
MUDANÇA DE PARADIGMA

cultivo de células
X
detecção de biomoléculas

... lipídeos, proteínas, CO₂, metabólitos, components de membrana, etc...

MUDANÇA DE PARADIGMA

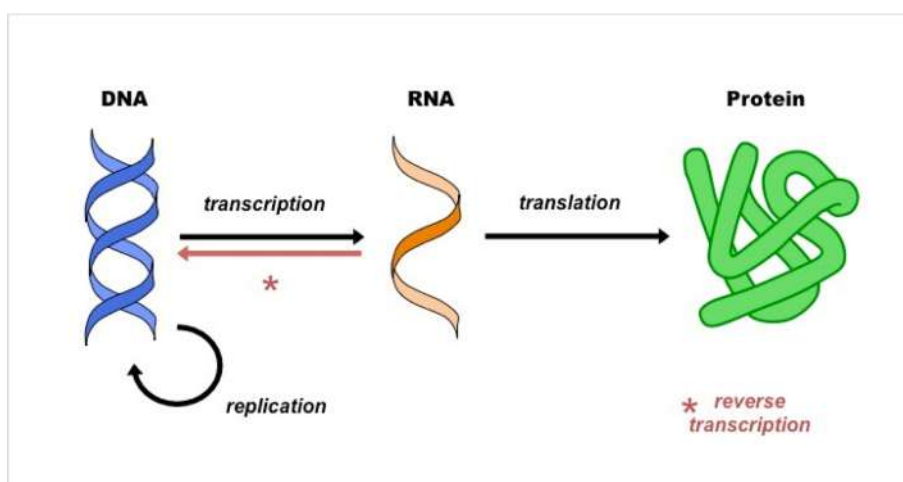
cultivo de células X detecção de ácido nucléicos



isolation of DNA from
environmental sample

Detecção e estudo de comunidades de
interesse

O USO DE DNA OU RNA

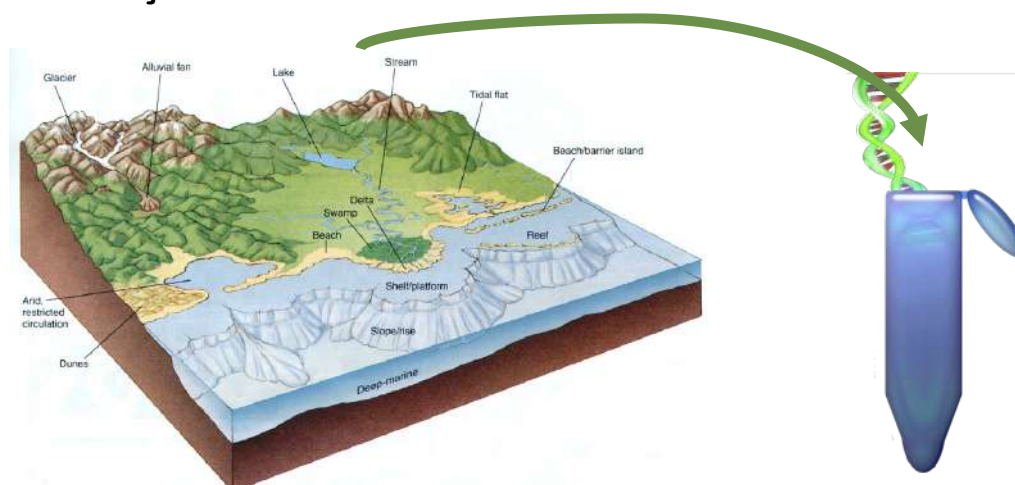


O USO DE DNA OU RNA

DNA	RNA
Mais estável (facilidade)	Molécula sensível
Maior quantidade	Informativa da funcionalidade
Maior repetibilidade	Baixa repetibilidade
Acesso aos não viáveis	

DESAFIOS METODOLÓGICOS

1. Extração dos ácidos nucleicos: DNA ou RNA



DESAFIOS METODOLÓGICOS

1. Extração dos ácidos nucleicos: DNA ou RNA

Extração indireta

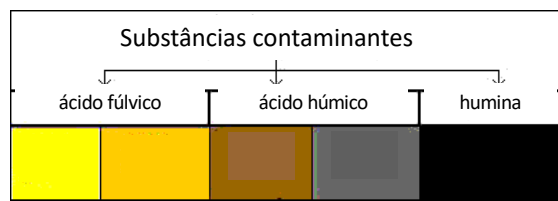
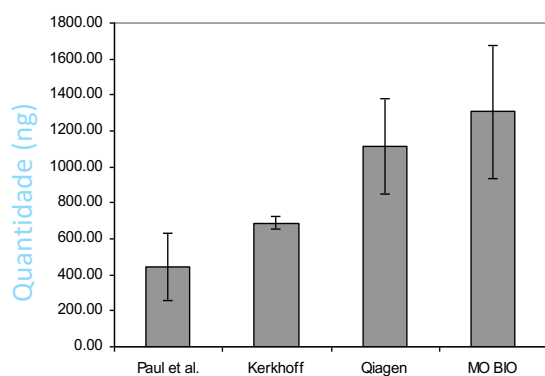


Extração direta



1. Concentração da amostra
2. Ruptura da parede celular
3. Extração do DNA
4. Purificação

K Q P M



30

DESAFIOS METODOLÓGICOS

2. Seleção da região alvo do estudo - PCR

PCR (Polimerase Chain Reaction)

- **Kary B. Mullis - 1983**

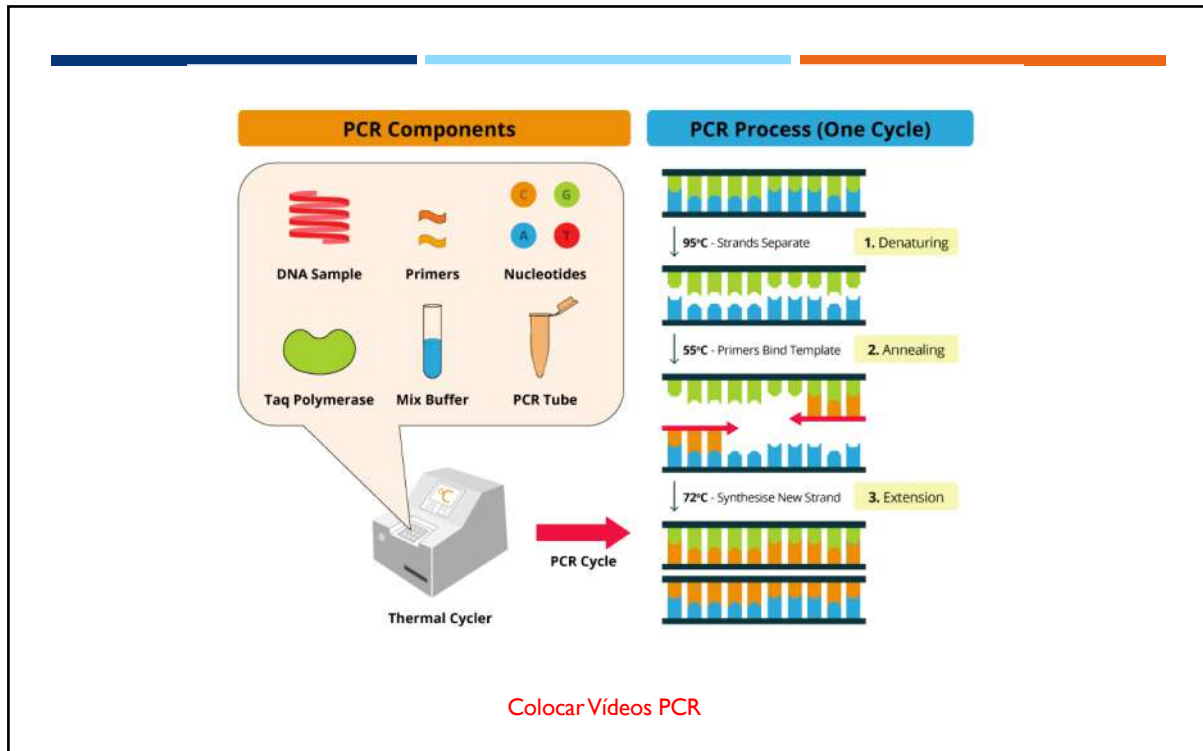
cientista da Cetus Corporation

- **prêmio Nobel de Química em 1993**

DESAFIOS METODOLÓGICOS

2. Seleção da região alvo do estudo - PCR

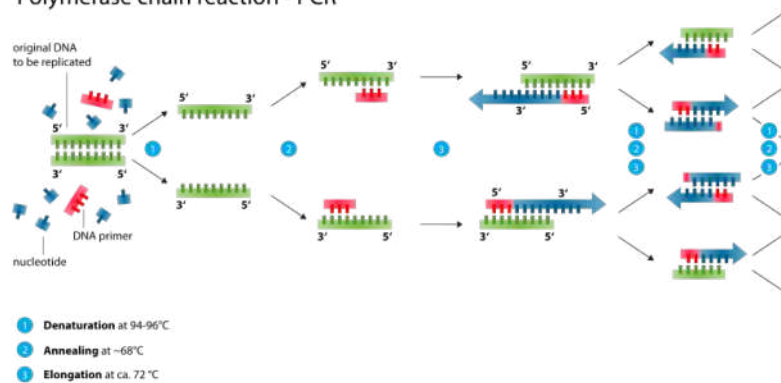
- ✓ **Amplificação de seqeências alvo**
- ✓ **Processo cíclico**
 - 15 a 40 ciclos
 - realizado por mudança de temperatura
- ✓ **Produção de 2 a 4 mg DNA em 1-3 hs**
- ✓ **Específico** (amplifica sequência-alvo na presença de DNA genômico)
- ✓ **Sensível** (detecta até 1 sequência de molde)
- ✓ **Flexível** (muitas variações da técnica básica de PCR)

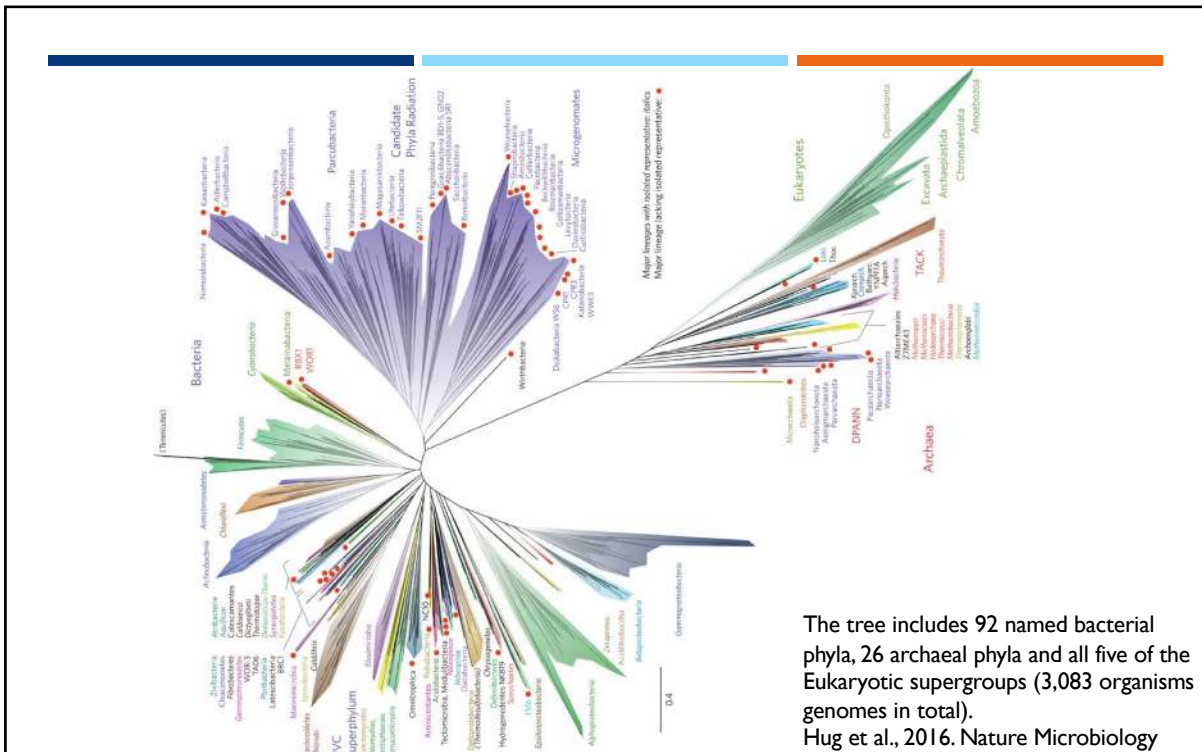
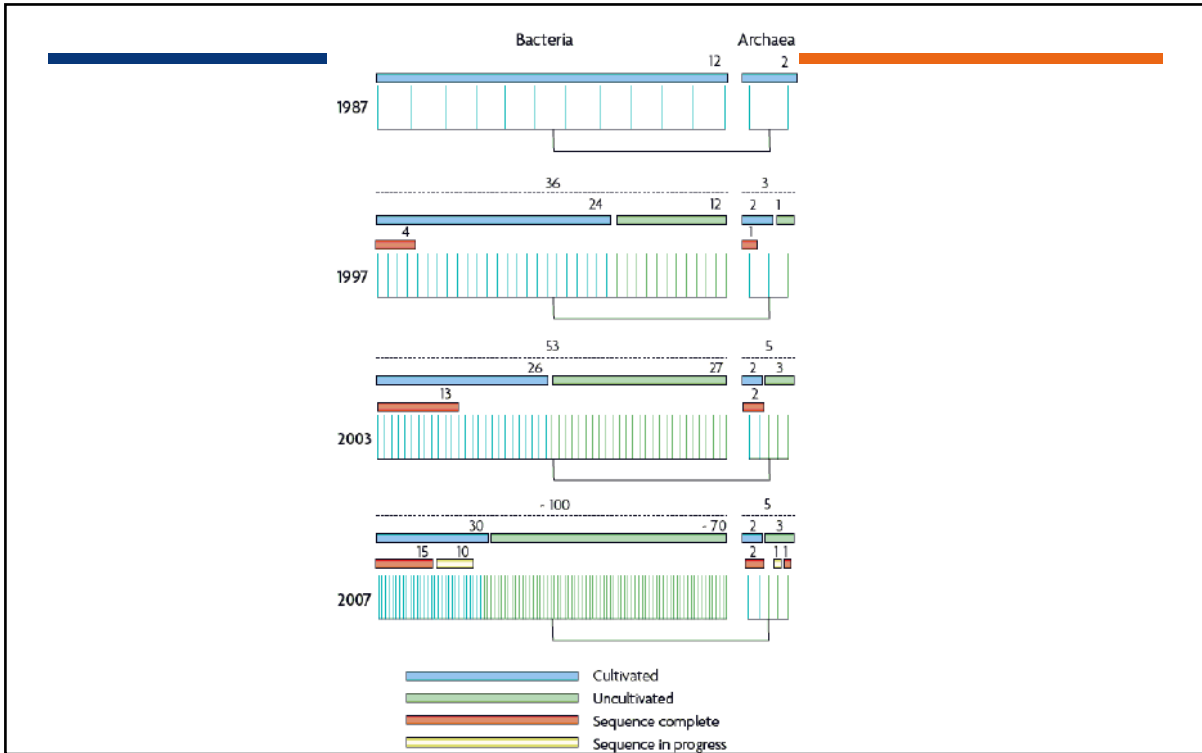


$$N = N_0 2^n$$

- ✓ N = número de moléculas amplificadas
- ✓ N_0 = número inicial de moléculas
- ✓ n = número de ciclos de amplificação

Polymerase chain reaction - PCR





Microbiologia do solo

Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso
Author

Fernando Dini Andreote
Author

Sinopse

Este livro traz estudos sobre microrganismos que habitam o solo, microrganismos que vivem em associação com animais e com plantas.



[Baixar PDF](#)

Categorias:
[Microbiologia do solo](#)

ISBN-13 (15)
978-85-86481-56-7

doi
10.11606/9788586481567

PORTAL DE LIVROS ABERTOS DA USP

OBRIGADO!!!

|fdandreo@gmail.com |fdandreo@usp.br|

37