

## Scientific Electronic Archives

Issue ID: Sci. Elec. Arch. Vol. 13 (11)

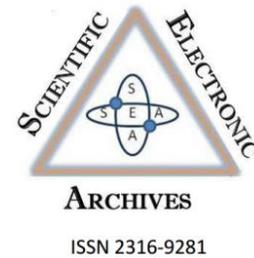
November 2020

DOI: <http://dx.doi.org/10.36560/131120201240>

Article link

<http://sea.ufr.edu.br/index.php?journal=SEA&page=article&p=view&path%5B%5D=1240&path%5B%5D=pdf>

Included in DOAJ, AGRIS, Latindex, Journal TOCs, CORE, Discoursio Open Science, Science Gate, GFAR, CIARDRING, Academic Journals Database and NTHRYS Technologies, Portal de Periódicos CAPES, CrossRef, ICI Journals Master List.



## Densidade e caracterização morfológica de bactérias em sistemas de produção integrados e exclusivos

### Density and morphological characterization of bacteria in integrated and exclusive production systems

A. R. B. Zanco<sup>1</sup>, A. Ferreira<sup>2</sup>, G. C. M. Berber<sup>3</sup>, E. N. Gonzaga<sup>1</sup>, D. C. C. Sabino<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Agronomia - Universidade Federal de Mato Grosso - Campus Sinop

<sup>2</sup> Embrapa Agrossilvipastoril

<sup>3</sup> Universidade Federal de Rondonópolis

Author for correspondence: [danielesabino@ufmt.br](mailto:danielesabino@ufmt.br)

**Resumo.** Os diferentes sistemas integrados de produção podem interferir diretamente na comunidade bacteriana presente nestes ambientes. Assim, o presente estudo teve como objetivo analisar a ocorrência e a diversidade bacteriana, e a influência dos períodos seco e chuvoso sistemas integrados e exclusivos de produção. Também foram avaliadas uma área de pousio e uma de mata nativa. As amostras foram coletadas em março e setembro de 2012. Os isolamentos foram realizados em placas de Petri com meio DYGS. Após 48h foram quantificadas as Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e realizada caracterização fenotípica. A densidade de bactérias variou entre  $10^6$  e  $10^7$  UFC  $g^{-1}$  solo. O sistema de cultivo afetou a quantidade de UFC bacteriana apenas no período chuvoso, sendo que a maior quantidade observada na área com lavoura. Foi observado maior quantidade de UFC no período da chuva, independente do sistema de cultivo. A similaridade dos isolados, a 80%, promoveu a formação de 13 grupos durante a época de chuva e 14 no período seco. Isolados com capacidade de solubilizar fosfato *in vitro* foram obtidos de todas as áreas nas duas épocas avaliadas, embora esta característica tenha sido predominante nas bactérias isoladas no período chuvoso.

**Palavras-chave:** quantificação bacteriana; integração lavoura pecuária floresta; solo; fosfato.

**Abstract.** The different integrated production systems can directly interfere with its bacterial community. The present study aimed to assess density, bacterial diversity and the influence of dry and rainy season in different integrated and an exclusive production system. The fallow and a native forest area was assessed to. Samples were collected in 2012 March and September. The isolation were carried out into Petri dishes containing DYGS medium. The number of colony forming units (CFU) was counted after 48 hours and. The bacterial density ranged between  $10^6$  and  $10^7$  CFU  $g^{-1}$  soil. The crop system affected the dynamics of the bacterial community only in the rainy season. The rainy season showed greater density of total bacteria when compared to the dry period regardless of the cropping system. The dendrograms with 80 % similarity showed thirteen and fourteen groups in the rainy and dry seasons. Isolates with the capacity to solubilize phosphate *in vitro* were obtained from all areas in the two seasons, but this feature has been prevalent in bacteria isolated during the rainy season.

**Keywords:** bacterial count; integration; soil; phosphate.

### Introdução

A integração lavoura-pecuária-floresta pode ser considerada uma estratégia de produção sustentável que reúne agricultura, pecuária e floresta em rotação, consórcio ou sucessão em uma mesma área (Balbino

et al. 2011). De acordo com Macedo (2000), integrar árvores em meio às lavouras ou pastagens pode ser uma alternativa à produção intensiva em monoculturas, resultando em maior diversidade

biológica e exploração de nichos diversificados dentro do sistema.

Pereira et al. (2000) ressaltam que avaliar as comunidades microbianas nos solos é de grande importância na caracterização das relações entre os diferentes grupos e espécies de micro-organismos, assim como na identificação de fatores ambientais que exercem influência no equilíbrio microbiológico dos solos. A interação entre os sistemas de produção e as condições climáticas, como seca e chuva, podem interferir diretamente nas comunidades microbianas presentes nesses ambientes. Também é necessário ter o conhecimento dos efeitos causados pelos cultivos agrícolas sobre as comunidades bacterianas, devido às transformações promovidas por esses micro-organismos. De acordo com Moreira & Costa (2004) as consequências destas influências no solo assim como na comunidade microbiana promovem interferências na capacidade de regeneração da floresta e crescimento das plantas.

A diversidade de micro-organismos pode ser considerada um fator importante na reabilitação e sustentabilidade de ecossistemas (Neroni 2007), uma vez que a microbiota atua na transformação da matéria orgânica e ciclagem dos nutrientes. Além da diversidade, a biomassa e enzimas são ferramentas utilizadas como parâmetros microbiológicos que podem indicar a qualidade do solo. A quantificação seguida pela caracterização morfológica permite avaliar a diversidade desses micro-organismos. Esses parâmetros microbiológicos têm sido considerados bons indicadores de alterações no solo devido à resposta rápida dos micro-organismos às variações ambientais. Assim, a quantidade e diversidade microbiana podem ser utilizadas como indicadores biológicos das transformações que ocorrem no solo (Rezende et al. 2004).

De acordo com Vieira & Nahas (2000), entre os diversos métodos para verificar a densidade de bactérias um dos mais utilizados é a contagem de unidade formadora de colônia (UFC) em placa de Petri, tratando-se de uma diluição inoculada em meio de cultura a uma determinada temperatura e tempo de inoculação. Caracterizar esses isolados morfológicamente, apesar de ser uma técnica trabalhosa e um pouco subjetiva, é importante como a primeira aproximação para verificar a diversidade bacteriana, podendo ser utilizada para o agrupamento morfológico de indivíduos semelhantes. Além de quantificar as bactérias presentes nos solos, também é importante verificar a capacidade de solubilização de fosfato dos isolados presentes em diferentes tipos de solo. O fósforo é encontrado em baixa disponibilidade no solo, sendo necessárias altas dosagens desse nutriente para suprir as

necessidades das plantas (Chagas Junior et al. 2010). Assim, é altamente desejável a busca por microrganismos do solo que possam melhorar o suprimento deste nutriente para as culturas (Silva Filho et al. 2002),

Sabendo que no estado de Mato Grosso a implantação de sistemas integrados de produção tem sido prática cada vez mais adotada, é de extrema importância buscar mais informações e alternativas para utilizar de maneira sustentável os recursos naturais, uma vez que o estado apresenta grande produção agropecuária.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivos: i) analisar a ocorrência e a diversidade bacteriana presente no solo usado para monocultivo, sistemas integrados de produção e mata nativa; ii) verificar os possíveis efeitos da variação sazonal e de uso da terra sobre essas comunidades microbianas; iii) constatar a presença de isolados bacterianos capazes de solubilizar fosfato *in vitro*.

## Métodos

O município de Sinop está localizado em uma região de transição de biomas denominada Ecótono Cerrado/Amazônia, apresentando duas estações bem definidas, sendo chuvosa no verão e seca no inverno. O solo utilizado é do primeiro ano de cultivo de um experimento, implantado em novembro de 2011, localizado na área experimental da Embrapa Agrossilvipastoril, no município de Sinop-MT. O experimento foi composto por 5 tratamentos com diferentes arranjos (1- eucalipto; 2- lavoura com soja no verão e milho safrinha; 3- pastagem (*Brachiaria*); 4- soja no verão com milho safrinha intercalado com eucalipto; 5- pastagem intercalada com eucalipto). O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com 4 repetições. Uma área de remanescente de floresta nativa próxima ao experimento e uma área de pousio também foram incorporadas às avaliações (Tabela 1). Nos tratamentos com floresta, o eucalipto foi plantado em faixas de linhas triplas (3,5 x 3,0 m) espaçadas de 30 m e a braquiária utilizada foi a *B. brizantha* cv. Marandu. A coleta do solo foi realizada em março de 2012 (período chuvoso) e setembro de 2012 (período seco). Foram coletadas 20 amostras simples de solo, para formar uma amostra composta, em todos os tratamentos com o auxílio de trado holandês, o qual foi lavado com água, banhado em etanol 70% e secado entre cada amostra. As amostras de solo retiradas foram colocadas em sacos plásticos e transportadas em caixa térmica para a câmara fria, onde ficaram armazenadas a 4 °C, até a realização das análises.

**Tabela 1:** Principais características das áreas de coleta de amostras de solo coletadas na área experimental da Embrapa Agrossilvipastoril em Sinop - MT.

Área	Sigla	Nome	Características Principais no Ano de Coleta
1	F	Floresta	Plantio de eucalipto em monocultura
2	L	Lavoura	Lavoura de soja no período chuvoso seguido de milho safrinha
3	P	Pastagem	Área com braquiária <i>B. brizantha</i> cv. Marandu sem gado
4	iLF	Integração Lavoura Floresta	Plantio de eucalipto integrado com soja (chuva) seguido de milho safrinha
5	iPF	Integração Pastagem Floresta	Plantio de eucalipto integrada com pastagem <i>B. brizantha</i> sem gado
6	MN	Mata Nativa	Área florestal com vegetação natural, sem interferência humana
7	PO	Pousio	Área pós interrupção de atividades agrícolas por 3 anos

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia, situado na UFMT – Universidade Federal de Mato Grosso, Campus de Sinop-MT. De cada amostra composta, foi pesado 1g do solo coletado e diluído em 9 ml de solução salina (0,85% de NaCl). Os isolamentos foram conduzidos de acordo com a técnica de microgota adaptada de Romeiro 2007 e Silva et al. 2007, a qual consiste em transferir 3 gotas de 20 µL de cada uma das diluições ( $10^{-2}$  a  $10^{-6}$ ), para placas de Petri (divididas em 3 partes) contendo meio DYGS (Rodrigues Neto et al. 1986). A temperatura utilizada foi de 28 °C, por dois dias. A cada 24 horas foram realizadas contagens do número de unidades formadoras de colônias (UFC) de cada tratamento. Após as contagens, foram realizadas purificações de isolados bacterianos com características morfológicas diferentes. Cada isolado foi transferido para uma nova placa de Petri contendo meio DYGS, repetindo este procedimento até a completa purificação dos isolados. Os isolados puros foram cultivados e armazenados em frascos de vidro contendo meio DYGS inclinado, foi adicionado glicerina e fechado com tampa de borracha.

Posterior à purificação, os isolados foram caracterizados morfológicamente utilizando as seguintes características culturais: tamanho das colônias (pequeno, médio, grande), coloração (amarela, branca, bege, rosa, laranja, transparente), margem (lisa, ondulada, denteada), forma (circular, irregular, filamentosa, puntiforme), densidade (brilhosa, opaca) e elevação (elevada, plana).

Os dados da estimativa de unidades formadoras de colônia presentes no solo foram comparados quanto à normalidade (teste de Shapiro-Wilk) sendo os transformados em Log (x) e submetidos ao teste F utilizando o programa estatístico SISVAR (Ferreira 1998).

O índice de diversidade utilizado foi o de Shannon-Wiener ( $H'$ ), calculado através da equação:  $H' = -\sum_{i=1}^s p_i \times \ln p_i$ ; onde  $S$  é o número de espécies (número de grupos formados com as diferentes características culturais),  $p_i$  é a proporção da espécie  $i$ , estimada como  $n_i/N$ , onde  $n_i$  é a medida de importância da espécie  $i$  (número de isolados), e  $N$  é o número total de isolados.

A similaridade entre os isolados, através de suas características fenotípicas em meio de cultura foi avaliada por uma matriz, no qual foram atribuídos os seguintes parâmetros: Cor: 0-bege, 1-branca, 2-amarelo, 3-laranja, 4-rosa, 5-transparente; Borda: 0-lisa, 1-ondulada, 2-dentada; Forma: 0-circular, 1-irregular, 2-filamentosa, 3-puntiforme; Densidade: 0-opaca, 1-brilhosa; Elevação: 0-elevada, 1-plana. Os dados foram comparados e a similaridade entre os isolados foi estimada pelo coeficiente *Simple Matching*- SM, e agrupada pelo método das distâncias médias UPGMA (*Unweighted Pair Group Method*) e representados graficamente por um dendrograma construído pelo programa Multivariate Statistical Package 3.12 -MVSP (Kovach 2000).

Os isolados foram avaliados quanto à capacidade de solubilizar fosfato inorgânico, seguindo a metodologia descrita por Santos (2012). Para isso, foram transferidos em triplicatas, para placas contendo meio com fosfato de cálcio dibásico (10 g/L de glicose, 5 g/L de  $NH_4Cl$ , 1 g/L de  $Mg. SO_4. 7 H_2O$ , 4 g/L de  $CaHPO_4$ , 15 g/L de ágar nutriente, com pH ajustado para 7,2), inoculadas a 28 °C por 7 dias. A capacidade de solubilização de fosfato foi caracterizada pela presença (+) ou ausência (-) de um halo translúcido ao redor da colônia.

## Resultados e discussão

Foram observadas variações sazonais durante as épocas avaliadas. Segundo os dados do INMET a precipitação total e a umidade relativa média no mês de março foram de 134,90 mm e 80,60% respectivamente, enquanto que no mês de setembro não houve precipitação e a umidade relativa média foi de 48,74%. De acordo com Zilli et al. (2003), alterações climáticas podem promover variações na comunidade microbiana do solo, uma vez que esses micro-organismos são suscetíveis às variações sazonais, principalmente de temperatura e umidade. Provavelmente devido a essa variação durante as estações do ano, ocorreu uma menor densidade de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de solo em todas as áreas estudadas na época da seca em relação ao período chuvoso (Tabela 2). A maior precipitação e umidade relativa da estação chuvosa podem ter relação com a maior densidade de UFC

por grama de solo obtida nesse período (Moreira e Siqueira 2006). Reis Júnior et al. (2004) e Souza et al. (2009) também observaram influência de fatores ambientais, como variações no sistema de cultivo ou manejo, sobre a comunidade de bactérias. Essas

alterações no decorrer do ano, principalmente quanto ao regime hídrico e ao clima da região podem estar relacionadas à variação da diversidade microbiana no solo (Rogers & Tate 2001).

**Tabela 2:** Comunidade bacteriana (Log da UFC.g<sup>-1</sup> solo) nos diferentes sistemas de produção integrados da área experimental da Embrapa Agrossilvipastoril em Sinop-MT, durante o período chuvoso e seco.

Tratamentos	Log UFC.g <sup>-1</sup> solo Chuva	Log UFC.g <sup>-1</sup> solo Seca
Floresta	7,38 a	6,85
Lavoura	7,63 a	6,90
Pastagem	7,61 a	6,97
iLF	7,60 a	6,71
iPF	7,43 a	7,02
Teste F*		
Tratamento	4,16*	0,61 <sup>NS</sup>
CV	1,49	4,43
Pousio	7,48	7,41
Mata Nativa	7,40	7,23

Teste F – calculado com base no log do número de UFC.g<sup>-1</sup> solo. NS: Não significativo; \*: Significativo (P < 0,05). As áreas de Pousio e Mata Nativa foram utilizadas apenas como referenciais, não fazendo parte do delineamento estatístico e não sendo utilizadas no teste de análise de variância. Valores seguidos da mesma letra dentro de cada coluna não diferem segundo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na coleta realizada durante o período chuvoso, todos os tratamentos apresentaram, em média, densidade bacteriana próxima a 10<sup>7</sup> UFC.g<sup>-1</sup> de solo. Houve diferença entre os tratamentos, sendo a área com lavoura a que apresentou maior quantidade de UFC bacteriana, seguida pelo tratamento de pastagem. O monocultivo de eucalipto apresentou a menor quantidade de UFC bacteriana (Tabela 2). Variações na quantidade de UFC de bactérias em função do cultivo da área também foram observadas por Pinto & Nahas (2002) que relatam ter encontrado maior número de bactérias totais na cultura do milho em relação ao de pastagem e de floresta. Durante a coleta realizada na época seca, não houve diferença significativa entre os tratamentos, fato este que pode ser explicado devido às condições durante a época seca não serem tão favoráveis para esses micro-organismos, uma vez que a temperatura foi elevada e o solo ficou seco, podendo ter interferido na quantidade de UFC do solo. O número de bactérias pode variar dependendo das condições edafoclimáticas (Souza et al. 2009).

Uma vez que as transformações microbianas, assim como as diferentes reações químicas do solo podem ser alteradas de acordo com os tipos de manejos adotados, a quantidade de bactérias totais não deve ser utilizada como o único fator indicador da qualidade biológica do solo, uma vez que a contagem determina o número de UFC em cada área e não possibilita verificar a diversidade ali presente (Theodoro et al. 2003). Vale ressaltar que se trata do primeiro ano de um experimento que será avaliado por dezesseis anos e por isso os efeitos de tratamentos são menos proeminentes nesse momento. O acompanhamento da área por um período maior provavelmente permitirá mensurar

melhor a influência dos tratamentos na quantidade de UFC bacteriana. Na área da mata nativa e de pousio, a quantidade de UFC, em relação às épocas do ano, não sofreu variações tão grandes quando comparadas com os demais tratamentos. De acordo com a análise de solo (Moreira 2014) essas áreas apresentam elevado teor de matéria orgânica e conforme Zilli et al. (2003), isso tende a manter a comunidade de micro-organismos mais estável ao longo do ano. Kennedy (1999) também relata que a diversidade microbiana tem relação com a estabilidade do ecossistema, uma vez que essas áreas não sofreram interferências do homem, se tornando mais estáveis do que as demais áreas, que são agricultáveis e estão em mudanças.

Conforme Gomes (2009), a utilização do meio DYGS favoreceu a obtenção de informações mais realísticas do número de bactérias por ser um meio rico, pouco seletivo e de rápido crescimento, permitindo o isolamento amplo e com baixa pressão de seleção, favorecendo a contagem direta em placas, além de beneficiar o crescimento de bactérias que não teriam habilidade de crescer em meios tradicionalmente utilizados.

O processo de isolamento das bactérias foi eficiente para obter a diversidade morfológica bacteriana em cada tratamento estudado. Foram obtidos no total 230 isolados, sendo 109 no período chuvoso e 121 no período seco. Assim como a quantidade de UFC encontrada nas diferentes épocas, houve diferença nas características morfológicas das colônias dos isolados. Quanto à borda dos isolados, a maioria foi caracterizada como lisa, apenas as áreas iPF (durante a seca) e MN (durante a chuva) apresentaram maior porcentagem de colônias com borda ondulada. Apesar de serem

encontradas colônias de diferentes cores, a cor bege seguida pela cor branca foram as que se destacaram, sendo a cor branca a mais encontrada no período seco e a bege no período chuvoso. Outra característica que teve variação entre épocas e entre tratamentos foi a densidade das colônias. No período chuvoso 62,16% dos isolados foram caracterizados com densidade opaca, apenas os tratamentos de pastagem e iLF obtiveram maior porcentagem de isolados com densidade brilhosa. Já 61,48% dos isolados do período seco apresentaram densidade brilhosa, onde apenas a área da MN diferiu. Referente à elevação, durante a coleta da chuva, as áreas iLF, MN e PO apresentaram colônias com

elevação na maioria dos isolados, diferente da época seca em que todos os tratamentos apresentaram a maioria dos isolados com colônias planas.

Fatores ambientais assim como tipo de solo e regime hídrico são fatores determinantes da estrutura da comunidade microbiana (Gomes 2009). Assim foram encontradas comunidades bacterianas com características morfológicas diferentes entre os tratamentos. Entre as duas épocas do ano foi possível observar uma grande diversidade fenotípica das colônias, em meio de cultura. As características encontradas nos isolados presentes nos diferentes solos permitiram a formação de 77 grupos fenotípicos (Tabela 3).

**Tabela 3:** Descrição das características dos fenótipos culturais obtidas de amostras de solo coletadas em duas épocas em áreas com diferentes uso do solo.

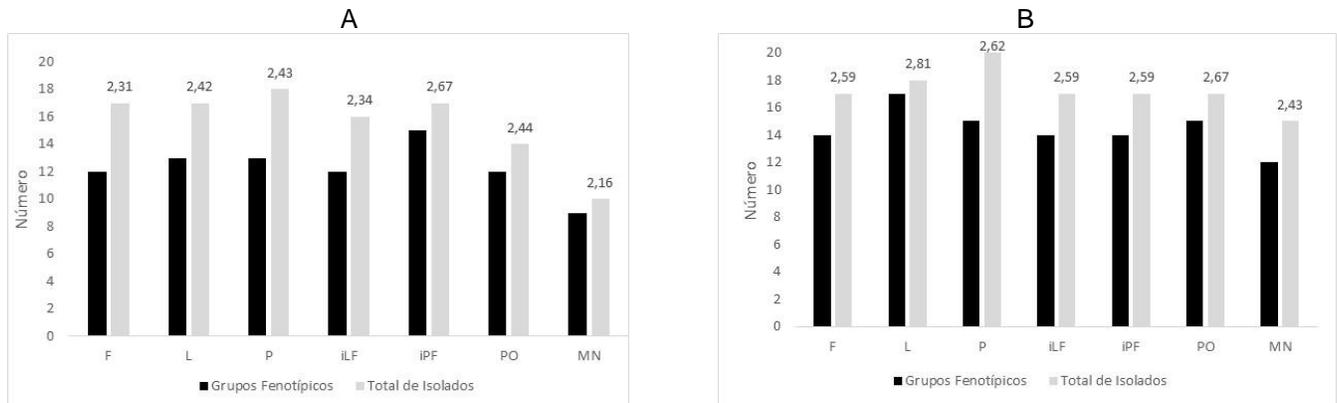
Fenótipos culturais	Descrição <sup>(1)</sup>						
1	0-0-0-0-1	21	0-2-2-0-1	41	1-2-0-0-1	61	4-0-0-1-0
2	0-0-0-1-0	22	0-2-3-0-1	42	1-2-0-1-1	62	4-0-0-1-1
3	0-0-0-1-1	23	0-2-3-1-1	43	1-2-1-0-0	63	4-1-0-0-0
4	0-0-1-0-0	24	1-0-0-0-0	44	1-2-1-0-1	64	5-0-0-0-0
5	0-0-1-0-1	25	1-0-0-0-1	45	1-2-2-0-1	65	5-0-0-0-1
6	0-0-1-1-1	26	1-0-0-1-0	46	1-2-2-1-1	66	5-0-0-1-0
7	0-0-2-0-0	27	1-0-0-1-1	47	1-2-3-0-1	67	5-0-0-1-1
8	0-0-2-0-1	28	1-0-1-0-1	48	1-2-3-0-1	68	5-0-1-1-1
9	0-1-0-0-0	29	1-0-3-0-1	49	2-0-0-1-0	69	5-0-2-1-0
10	0-1-0-0-1	30	1-0-3-1-1	50	2-0-0-1-1	70	5-1-0-0-1
11	0-1-0-1-1	31	1-1-0-0-1	51	2-0-1-1-0	71	5-1-0-1-0
12	0-1-1-0-1	32	1-1-0-1-1	52	2-0-3-1-1	72	5-1-0-1-1
13	0-1-1-1-0	33	1-1-1-0-0	53	2-1-0-1-0	73	5-1-1-0-1
14	0-1-1-1-1	34	1-1-1-0-1	54	2-1-2-0-1	74	5-1-1-1-1
15	0-1-3-0-1	35	1-1-1-1-1	55	2-1-3-0-1	75	5-1-3-0-1
16	0-1-3-1-1	36	1-1-2-0-1	56	2-2-0-1-1	76	5-1-3-1-1
17	0-2-0-0-1	37	1-1-2-1-1	57	3-0-0-0-0	77	5-2-1-0-0
18	0-2-1-0-0	38	1-1-3-0-1	58	3-0-0-1-0		
19	0-2-1-0-1	39	1-1-3-1-1	59	3-0-0-1-1		
20	0-2-1-1-1	40	1-2-0-0-0	60	4-0-0-0-0		

<sup>(1)</sup> Descrição: 1º valor (cor): 0-bege, 1-branca, 2-amarelo, 3-laranja, 4-rosa, 5-transparente; 2º valor (borda): 0-lisa, 1-ondulada, 2-dentada; 3º valor (forma): 0-circular, 1-irregular, 2-filamentosa, 3-puntiforme; 4º valor (densidade): 0-opaca, 1-brilhosa; 5º valor (elevação): 0-elevada, 1-plana.

O número de fenótipos culturais, em relação ao número total de isolados por área, variou entre os períodos (Figura 1). Durante a época chuvosa foram observados diversos grupos fenotípicos em cada área, sendo que a área com mata nativa foi a que apresentou menor relação entre o número de isolados e fenótipos encontrados, uma vez que os dez isolados formaram nove grupos fenotípicos. No período seco a área de pastagem apresentou a menor proporção de fenótipos culturais em relação ao número de isolados, diferente da lavoura que apresentou uma grande proporção de fenótipos culturais. De modo geral, a época seca apresentou menor relação entre os grupos fenotípicos e o total de isolados caracterizados em cada área. Com exceção do tratamento de integração pecuária e floresta, todas as áreas apresentaram maior índice de diversidade de Shannon na época seca (Figura 1). Na época

chuvosa a área de integração pecuária e floresta foi a com maior diversidade e durante a época seca foi o tratamento de lavoura. A menor diversidade foi encontrada na área de mata nativa nas duas épocas (Figura 1).

Entre os grupos morfológicos possíveis, houve o predomínio de três grupos durante o período chuvoso, 2, 49 e 66, representando aproximadamente 30% do total de isolados obtidos durante esse período. Em relação a esses três grupos predominantes a única característica diferente entre eles foi a cor, sendo isolados com borda lisa, forma circular, densidade brilhosa e apresentando elevação. No período seco, os três grupos que obtiveram predomínio (2, 26 e 49) representaram 17% do total de isolados. Entre esses grupos com maior frequência, dois deles (2 e 49) também ocorreram no período chuvoso.



**Figura 1:** Relação entre a quantidade de fenótipos culturais e o total de isolados obtidos e índice de diversidade de Shannon-Wiener ( $H'$ ) (número acima das colunas) em áreas com diferentes uso de solo durante o período de chuva (A) e o período de seca (B). (F) floresta; (L) lavoura; (PA) pastagem; (iLF) integração lavoura e floresta; (iPF) integração pecuária e floresta; (PO) área de pousio; (MA) área de mata nativa.

A similaridade dos isolados foi estimada pelo coeficiente  $SM$  e agrupados pelo método de UPGMA obtendo-se um dendrograma de similaridade (dados não apresentados). Com 80% de similaridade. Na época chuvosa, os 109 isolados formaram 13 grupos enquanto que na época seca, os 121 isolados agruparam-se em 14 grupos. O maior número de grupos fenotípicos em meio de cultura foi obtido na época seca, provavelmente devido à maior quantidade de isolados caracterizados morfologicamente. Os resultados obtidos comprovam a variação sazonal dos isolados em relação às suas características fenotípicas. O grupo I, no período chuvoso foi o que apresentou a maior densidade de isolados (Tabela 4), sendo caracterizados em 8 fenótipos em meio de cultura (Tabela 3). Estes foram encontrados em todas as áreas, mostrando que as características desses fenótipos culturais possivelmente predominaram durante esta época. Os grupos V, VII e XI apresentaram apenas um isolado.

Durante a época seca, o grupo V teve um número elevado de isolados (26) em relação aos demais grupos, esses isolados foram encontrados nas diferentes áreas e tiveram 5 diferentes fenótipos culturais (Tabela 4). O grupo VIII foi o segundo com maior quantidade de isolados presentes, mas apresentou a maior número de fenótipos em meio de cultura (11). A área de pousio (grupo VII) e iLF (grupo XIV) foram as que apresentaram um único grupo fenotípico. Foi possível constatar a presença de alguns grupos predominantes, que apareceram em todos os tratamentos. Na época de chuva os grupos I e III estavam presentes em todos os tratamentos. O

grupo V e o grupo IX apareceram somente na área de floresta e o grupo VII na área de pastagem. Durante a época seca o grupo II e VIII foram predominantes em todos os tratamentos e o grupo VII apareceu somente na área de pousio assim como o grupo XIV somente na integração lavoura e floresta (Tabela 4).

Quando os isolados foram submetidos ao teste para verificar a capacidade de solubilização de fosfato foi observado que a maior quantidade foi obtida no período chuvoso (Tabela 5). As áreas de lavoura, iPF, pousio e mata nativa apresentaram todos os isolados com capacidade de solubilização, enquanto que na época seca apenas o tratamento de iPF apresentou 100% dos isolados solubilizadores. Santos et al. (2012), estudando bactérias diazotróficas endofíticas de raiz e da rizosfera de cana-de-açúcar, utilizando o mesmo meio de cultura deste trabalho, obteve 90% dos isolados com capacidade de solubilizar fosfato inorgânico *in vitro*. Essa grande porcentagem de isolados positivos para solubilização pode estar associada à fonte de fosfato utilizada no meio de cultura teste, a qual parece ser de fácil solubilização. Uma alternativa para reduzir essa grande porcentagem de isolados positivos seria o uso de outras fontes de fosfato mais complexas, a fim de selecionar os isolados dentro desse grupo de aproximadamente 90% de positivos. Conforme Silva Filho et al. (2002), a quantidade de fósforo imobilizado pelos micro-organismos, o tipo de fósforo e a interação dos isolados são alguns dos fatores que podem interferir na capacidade de solubilização de fosfato.

**Tabela 4:** Grupos fenotípicos culturais formados após a análise no programa MVSP com similaridade igual a 80%.

Agrupamento <sup>(1)</sup>	Áreas e quantidade de isolados obtidos <sup>(2)</sup>	Número de Isolados <sup>(3)</sup>	Fenótipos culturais <sup>(4)</sup>
<b>PERÍODO SECO</b>			
I	Floresta (2)- Pasto (3)- ILF (1)- Pousio (1)	7	03, 06
II	Floresta (1)- Lavoura (1)- Pasto (4)- ILF (2)- IPF (2) Pousio (1)- Mata (1)	12	27, 50, 52, 59, 67, 68
III	Floresta (1)- Lavoura (1)- IPF (1)- Mata (1)	4	1, 25, 65
IV	Pousio (1)- Mata (1)	2	28
V	Floresta (2)- Lavoura (5)- Pasto (2)- ILF (6)- IPF (4)- Pousio (4)- Mata (3)	26	2, 26, 49, 61, 66
VI	Pasto (1)- Pousio (1)	2	24, 64
VII	Pousio (1)	1	71
VIII	Floresta (5)- Lavoura (2)- Pasto (5)- ILF (2)- IPF (3)- Pousio (2)- Mata (1)	20	32, 35, 37, 39, 42, 46, 48, 52, 56, 72, 74
IX	Floresta (1)- Lavoura (2)- ILF (1)- IPF (1)- Pousio (2)	7	14, 16, 17, 20, 23
X	Floresta (2)- Lavoura (3)- Pasto (1)- ILF (1)- Pousio (3)- Mata (3)	13	5, 8, 12, 15, 19, 22, 41
XI	Lavoura (1)- Pasto (1)- Mata (1)	3	04, 18
XII	Floresta (3)- Lavoura (2)- Pasto (3)- IPF (3)- Pousio (1)- Mata (1)	13	33, 34, 38, 43, 44, 45, 47, 54, 77
XIII	Lavoura (1)- ILF (3)- IPF (3)	7	10, 17, 31, 41
XIV	ILF (1)	1	9
<b>PERÍODO CHUVOSO</b>			
I	Floresta (7)- Lavoura (5)- Pasto (8)- ILF (5)- IPF (6)- Pousio (4)- Mata (1)	36	24, 26, 49, 57, 58, 60, 61, 66
II	Floresta (1)- Mata (1)	2	51, 69
III	Floresta (4)- Lavoura (4)- Pasto (2)- ILF (3)- IPF (2)- Pousio (1)- Mata (2)	18	02, 03
IV	Floresta (2)- Lavoura (3)- Pasto (2)- ILF (1)- Mata (2)	10	27, 32, 59, 62, 72
V	Floresta (1)	1	25
VI	Lavoura (1)- Pasto (1)- ILF (2)- IPF (1)	5	5, 40, 53, 63, 66
VII	Pasto (1)	1	7
VIII	Floresta (3)- Lavoura (1)- ILF (2)- Pousio (2)	8	28, 29, 35, 36, 47, 55, 73, 75
IX	Pasto (3)- IPF (1)-Pousio (2)	6	4, 15, 21, 22, 47
X	Floresta (2)- Pasto (1)- ILF (1)- IPF (2)- Pousio (4)- Mata (3)	13	14, 16, 23, 35, 37, 39, 48, 76
XI	Floresta (1)	1	13
XII	Lavoura (2)- ILF (1)- IPF (1)- Pousio (1)	5	10, 41, 70
XIII	ILF (1)- IPF (1)	2	11

<sup>(1)</sup>Grupos formados a 80% de similaridade estimados pelo coeficiente *SM* e agrupados pelo método UPGMA. <sup>(2)</sup>Local de isolamento e a quantidade de isolados obtidos de cada área. <sup>(3)</sup>Número de de isolados presentes no grupo. <sup>(4)</sup>Fenótipos culturais presentes em cada grupo conforme descrito na Tabela 3.

**Tabela 5:** Ocorrência de bactérias solubilizadoras de fosfato em áreas com diferentes uso do solo durante o período chuvoso e seco.

Área	PERÍODO CHUVOSO		PERÍODO SECO	
	Nº de isolados	% de isolados positivos	Nº de isolados	% de isolados positivos
F	17	70,59	17	70,59
L	17	100	18	72,22
P	18	94,40	20	65
iLF	16	87,50	16	87,50
iPF	14	100	16	100
PO	13	100	16	81,25
MN	10	100	15	86,67

(F) floresta; (L) lavoura; (PA) pastagem; (LF) integração lavoura e floresta; (PF) integração pecuária e floresta; (PO) área de pousio; (MA) área de mata nativa.

### CONCLUSÕES

A densidade de bactérias foi influenciada pela época do ano, sendo que no período chuvoso foram observadas as maiores quantidades de UFC.g<sup>-1</sup> de solo tendo as áreas com floresta de eucalipto, em arranjos simples ou integrado, apresentando as menores quantidades de UFC bacterianas por grama de solo.

Os isolados bacterianos apresentaram diferenças fenotípicas em meio de cultura, sendo que a 80% de similaridade, foram observados padrões fenotípicos que se distinguiram em função da época do ano, com a ocorrência de alguns grupos em todas as áreas independentemente do tipo de uso do solo. A presença de bactérias solubilizadoras de fosfato variou conforme a área e a época do ano.

### AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e a Embrapa Agrossilvipastoril pelo apoio financeiro. Ao Dr. Austeclínio Lopes de Farias Neto pelo apoio no delineamento e condução do experimento no campo experimental. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida. A Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT) pela realização das análises.

### REFERÊNCIAS

Balbino, L. C.; Cordeiro, L. A. M.; Porfírio-Da-Silva, V.; Moraes, A. de; Martínez, G. B.; Alvarenga, R. C.; Kichel, A. N.; Fontaneli, R. S.; Santos, H. P. dos; Franchini, J. C.; Galerani, P. R. Evolução tecnológica e arranjos produtivos de sistemas de integração lavoura-pecuária-floresta no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 46, n. 10, p. 1-12, out. 2011.

Chagas Junior, A. F.; Oliveira, L. A. de; Oliveira, A. N. de; Willerding, A. L. Capacidade de solubilização de fosfato e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. *Acta Scientiarum Agronomy*, Maringá, v. 32, n. 2, p. 359-366, 2010.

Ferreira, D. F. SISVAR - sistema de análise de variância para dados balanceados. Lavras: UFLA, 1998. 19 p.

Gomes, M. de L. *Bactérias endofíticas em cultivares de milho em áreas de cerrado e mata no Estado de Roraima*. 2009. 79f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2009.

INMET; Instituto Nacional de Meteorologia. Brasília. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/>>. Acesso em: 17 jan. 2014.

Kennedy, A. C. Bacterial diversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, Amsterdam, v. 74, n. 1, p. 65-76, jun. 1999.

Kovach Computing Services - KCS, 2000. MVSP - Multivariate Statistical Package 3.12a. Available from: <<http://kovcomp.co.uk>>.

Macedo, R. L. G. *Princípios básicos para o manejo sustentável de sistemas agroflorestais*. Lavras; UFLA: FAEPE, 157p, 2000.

Moreira, A.; Costa, D. G. Dinâmica da matéria orgânica na recuperação de clareiras da floresta amazônica. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 39, n. 10, p. 1013-1019, out. 2004.

Moreira, F. M. S.; Siqueira, J. O. *Microbiologia e bioquímica do solo*. 2.ed. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2006. 729p.

Moreira, G. M. Qualidade do solo em sistemas de integração lavoura, pecuária e floresta em Sinop – MT. 2014. 95f. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

Neroni, R. F. *Diversidade de bactérias diazotróficas associativas à Araucaria angustifolia no estado de São Paulo*. 2007. 60f. Dissertação (Mestrado em

- Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, São Paulo, Piracicaba, 2007.
- Pereira, J. C.; Neves, M. C. P.; Gava, C. A. T. Efeito do cultivo da soja na dinâmica da população bacteriana, em solos de cerrado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 35, n. 6, p. 1183-1190, jun. 2000.
- Pinto, C. R. O.; Nahas, E. Atividade e população microbiana envolvida nas transformações do enxofre em solos com diferentes vegetações. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 37, n. 12, p. 1751-1756, dez. 2002.
- Reis Junior, F. B.; Silva, M. F.; Teixeira, K. R. S.; Urquiaga, S.; Reis, V. M. Identificação de isolados de *azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* ssp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 28, n.1, p. 103-113, jan./fev. 2004.
- Rezende, L.A.; Assis, L.C.; Nahas, E. Carbon, nitrogen and phosphorus mineralization in two soils amended with distillery yeast. *Bioresource Technology*, v. 94, n. 2, p. 159-167, set. 2004.
- Rodrigues Neto, J.; Malavolta Júnior, V. A.; Victor, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *Citri* tipo B. *Summa Phytopathologica*. Campinas, v. 12, n. 1-2, p. 16, 1986.
- Rogers, B. F.; Tate, R. L. Temporal analysis of the soil microbial community along a toposequence in Pineland soils. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v. 33, n. 10, p.1389-1401, 2001.
- Romeiro, R.S. *Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão*. Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Disciplina FIP- 640. Bactérias Fitopatogênicas, Roteiro de aulas práticas, Aula 08 Unidade 09 Técnica de microgota, 2007, Viçosa: UFV. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dfp/bac/uni9.pdf>>. Acesso em: 13 janeiro de 2014.
- Santos, I. B. dos; Lima, D. R. M. de; Barbosa, J. G.; Oliveira, J. T. C.; Freire, F. J.; Kuklinsky-Sobral, J. Bactérias diazotróficas associativas a raízes de cana-de-açúcar: solubilização de fosfato inorgânico e tolerância à salinidade. *Bioscience Journal*, Uberlândia, v. 28, sup. 1, p. 142-149, mar. 2012.
- Silva Filho, G. N.; Narloch, C.; Scharf, R. Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de *Pinus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 37, n. 6, p. 847-854, jun. 2002.
- Silva, v. A. da; Dias, E. S.; Vale, R. H. P. do; Silva, R. da; Moreira, G. F. Isolamento e identificação de bactérias presentes nos solos de cobertura utilizados no cultivo do cogumelo *Agaricus blazei* Murril. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 31, n. 5, p. 1364-1373, set./out. 2007.
- Souza, M.S.T. de; Brasil, M. da S.; Santos, S.A. Caracterização de bactérias diazotróficas isoladas de gramíneas nativas do pantanal sul-mato-grossense. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 32., 2009, Fortaleza. *Anais*. Fortaleza: SBCS, 2009.5p.
- Theodoro, V.C.A.; Alvarenga, M.I.N.; Guimarães, R.J.; Mourão Júnior, M. Carbono da biomassa microbiana e micorriza em solo sob mata nativa e agroecossistemas cafeeiros. *Acta Scientiarum: Agronomy*, Maringá, v. 25, n. 1, p. 147-153, 2003.
- Vieira, f. C. S.; Nahas, E. Quantificação de bactérias totais e esporuladas no solo. *Scientia Agricola*, v. 57, n. 3, p. 539-545, jul./set. 2000.
- Zilli, j. E.; Rumjanek, N. G.; Xavier, G. R.; Coutinho, H. L. da C.; Neves, M. C. P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. *Cadernos de Ciência & Tecnologia*, Brasília, v. 20, n. 3, p. 391-411, set./dez. 2003.