

Estudo da microbiota do solo das Hortas Sociais do Instituto Politécnico de Bragança

Sara Luciana Freitas

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança
para obtenção do Grau de Mestre em Agroecologia*

Orientado por
Professora Doutora Maria Letícia Miranda Fernandes Estevinho

**Bragança
2016**

Tudo podes se tudo queres

(Lino, M.)

Nome: Sara Luciana Freitas

Orientador: Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho - Instituto Politécnico de Bragança

Aos meus pais e irmãos

À memória do avô Luís

Ao meu noivo Mathieu

À Fifi e ao Rubi

Agradecimentos

Ao terminar mais uma etapa da minha vida académica, quero agradecer com a maior gratidão, a todos aqueles que, de algum modo, contribuíram para a sua realização e conclusão.

Começo por agradecer a **Deus**, por tudo o que me tem proporcionado ao longo da minha vida e por toda a força interior para seguir em frente e não desanimar com as dificuldades.

À minha orientadora científica, Professora Doutora **Maria Letícia Miranda Fernandes Estevinho**, pela indicação do tema de trabalho, sugestões, esclarecimentos, conhecimentos transmitidos, dedicação, esforço e, sobretudo, pelo carinho e amizade demonstrada, apoio constante e paciência, sem os quais não tinha sido possível concluir esta etapa.

Ao Professor Doutor **Fernando Augusto Pereira** pela pessoa que é! Pelo apoio no tratamento estatístico dos dados experimentais, disponibilidade e paciência. Por todo o carinho, amizade e apoio prestado a todos os níveis.

À **equipa do Laboratório de Microbiologia** da Escola Superior Agrária de Bragança, por todo o apoio prestado e ajuda sempre que necessitei, em especial à Doutora **Ana Paula Pereira** e à Mestre **Vanessa Paula** pela partilha de conhecimento e experiência. Obrigado pela boa convivência e pelos momentos agradáveis no laboratório.

Ao **Ananias**, por toda a sua boa disposição, ajuda e companheirismo ao longo deste trabalho.

Ao meu noivo, **Mathieu Teulet**, por estar sempre do meu lado. Por todo o apoio incondicional, compreensão, ajuda, paciência e incentivo nos momentos mais difíceis. Por todo o amor, carinho e amizade ao longo destes anos.

Aos **meus pais**, por acreditarem sempre em mim. Mesmo distantes, sempre me ajudaram em tudo. Obrigado por todas as palavras queridas nas fases de dúvida e de medo, compreensão, incentivo e apoio incondicional. Obrigada por tudo o que fizeram por mim ao longo de toda a minha vida. A vocês devo tudo o que sou hoje. Obrigada pelos pais maravilhosos que são!

Aos **meus irmãos** especiais, pelo apoio em todos os momentos.

A memória do meu querido avô **Luís de Freitas**, que continua a iluminar a minha vida, sempre!

Aos **amigos** fantásticos que fazem parte da minha vida pessoal. Almas únicas que me enchem de alegria todos os dias. Obrigada por existirem!

Obrigada!

Índice Geral

RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII

CAPÍTULO 1.

INTRODUÇÃO	2
-------------------------	----------

CAPÍTULO 2.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
------------------------------------	----------

2.1 O solo como um corpo biológico.....	5
--	----------

2.1.1 Microbiota do solo	6
--------------------------------	---

2.1.1.1 Bactérias do solo	7
---------------------------------	---

2.1.1.2 Fungos do solo	9
------------------------------	---

2.1.1.3 Actinomicetas	12
-----------------------------	----

2.2 Características do solo como um habitat	14
--	-----------

2.2.1. Aspectos físicos do solo e relação com a microbiota	15
--	----

2.2.1.1 Textura do solo	15
-------------------------------	----

2.2.1.2 Estrutura do solo	15
---------------------------------	----

2.2.1.3 Espaço poroso	16
-----------------------------	----

2.3 Influência das propriedades químicas do solo	17
---	-----------

2.4 Influência das condições ambientais	19
--	-----------

2.5 Caracterização da área em estudo	20
---	-----------

2.5.1 Localização	20
-------------------------	----

2.5.2 Clima	21
-------------------	----

2.5.3 Solo	22
------------------	----

CAPÍTULO 3.

MATERIAL E MÉTODOS	24
---------------------------------	-----------

3.1 Amostragem	24
-----------------------------	-----------

3.2 Avaliação da qualidade microbiológica	25
--	-----------

3.2.1 Preparação das amostras	25
-------------------------------------	----

3.2.2 Meios de cultura	26
------------------------------	----

3.2.3 Quantificação de bactérias aeróbias mesófilas	26
---	----

3.2.4 Quantificação de fungos filamentosos e leveduras	27
--	----

3.2.5 Pesquisa de actinomicetas	27
3.3 Isolamento de fungos filamentosos	28
3.3.1 Caracterização macroscópica e microscópica	28
3.4 Isolamento de leveduras.....	29
3.4.1 Caracterização morfológica de leveduras	29
3.4.2 Identificação de isolados de leveduras	30
3.5 Isolamento de actinomicetas e avaliação da produção de antibióticos	32
3.6 Caracterização físico-química	33
3.6.1 Determinação do valor de pH	33
3.7 Análise Estatística	34
CAPÍTULO 4.	
RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 Avaliação microbiológica	36
4.2 Valores de pH.....	40
4.3 Caracterização dos isolados de fungos filamentosos e leveduras	42
4.3.1 Identificação macroscópica e microscópica de fungos filamentosos	42
4.3.2 Identificação de leveduras	50
4.4 Avaliação da produção de antibióticos por actinomicetas	53
4.4.1 Efeito dos metabolitos produzidos por Actinomicetas em bactérias	53
4.4.2 Intensidade da inibição	55
CAPÍTULO 5.	
CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXOS	73

Índice de Figuras

Figura 1 – Organismos do solo em seu habitat (Zinger, 2009).	6
Figura 2 – Hifas fúngicas envolvidas no processo de formação e estabilização dos agregados do solo.	12
Figura 3 - Taxa de reação microbiana a várias temperaturas	19
Figura 4 - Hortas comunitárias do IPB.....	20
Figura 5 - Localização geográfica da região de Bragança (A); localização das hortas comunitárias do IPB visualizada na aplicação de informação geográfica Google Earth	21
Figura 6 – Esquematização dos pontos de recolha das amostras de terra em 10 locais diferentes. Os pontos 1 a 5 correspondem à colheita na parcela superior das hortas e os pontos 6 a 10 à parcela inferior.	24
Figura 7 – Representação esquemática da preparação das amostras para quantificação de bactérias e fungos	25
Figura 8 – Aspeto de uma placa com colónias típicas de actinomicetas (setas vermelhas)	27
Figura 9 – Características macroscópicas (forma, topografia e margem) de fungos em meio sólido.	28
Figura 10 - Características morfológicas (forma, elevação e margem) de colónias de leveduras em meio sólido.	30
Figura 11 - Galeria API 20 C AUX.....	30
Figura 12 – Catálogo analítico <i>online</i> utilizado na identificação das espécies de leveduras através dos resultados positivos nas diferentes cúpulas da galeria. Após preenchidos os espaços, o programa é validado fornecendo a espécie correspondente	32
Figura 13 – Medidor de pH (<i>Mettler Toledo LE409</i>).....	33
Figura 14 – Representação gráfica ilustrando a presença de interação significativa entre a parcela e a profundidade sobre a abundância bacteriana (A) e ausência do efeito de interação sobre a abundância fúngica (B).....	38
Figura 15 – Aspeto macroscópico dos fungos filamentosos isolados	45
Figura 16 – Aspeto macroscópicos das leveduras isoladas: (A) <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> e (B) <i>Cryptococcus laurentii</i>	51
Figura 17 – Aspecto visual da presença de halo de inibição em <i>Bacillus subtilis</i> (A) e <i>Staphylococcus aureus</i> (B) e ausência de inibição em <i>Escherichia coli</i> (C) e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (D).....	53

Índice de Gráficos

Gráfico 1 – Variação das temperaturas máxima, média e mínima e da precipitação total registadas no período de 1971 a 2000.....	22
---	----

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Substratos presentes nas galerias API 20 C AUX	31
Tabela 2 – Densidade populacional de bactérias e fungos (média ± desvio padrão) e presença de actinomicetas existente no solo das hortas comunitárias do IPB.....	37
Tabela 3 – Resultados da Anova two-way à distribuição dos microrganismos consoante a parcela e a profundidade e interação entre os fatores.	38
Tabela 4 – Valores de pH (média ± desvio padrão) obtidos das amostras de solo analisadas (n = 20).	41
Tabela 5 – Características morfológicas (macroscópicas e microscópicas) dos fungos isolados no solo das hortas do IPB.	46
Tabela 6 - Características morfológicas e respetiva identificação das leveduras isoladas do solo das hortas do IPB.	52
Tabela 7 - Abundância de leveduras identificadas no solo das hortas do IPB	52
Tabela 8 – Resultado da atividade antimicrobiana dos Actinomicetas contra as bactérias alvo em amostras de terra colhidas nas parcelas superior e inferior nas profundidades 0-10 e 0-20 cm.	54
Tabela 9 - Resultados do teste não paramétrico à distribuição das áreas dos halos (mm ²).	56
Tabela 10 - Comparações entre as bactérias alvo segundo a área do halo (mm ²) de inibição.	56

Resumo

O solo constitui um dos principais reservatórios para uma infinidade de microrganismos. O presente trabalho teve como local de estudo as hortas comunitárias do Instituto Politécnico de Bragança (IPB), situadas na região de Trás-os-Montes, em Bragança. As amostras de solo foram colhidas em janeiro de 2016, a duas profundidades 0-10 e 10-20 cm, em 10 locais escolhidos aleatoriamente. O principal objetivo foi analisar a microbiota do solo, principalmente bactérias aeróbias mesófilas, fungos e actinomicetas, e avaliar a capacidade de produção de antibióticos por Actinomicetas.

Os resultados obtidos indicam valores de populações fúngicas dentro dos parâmetros estabelecidos para um solo fértil. O mesmo não se verificou para a população de bactérias aeróbias. Embora presentes no solo, apresentaram contagens inferiores aos valores médios estabelecidos para um solo fértil.

A população bacteriana mostrou uma tendência para diminuir com o aumento da profundidade. Este efeito não se observou na população fúngica. Aparentemente, o solo das hortas da parcela inferior tenderão a ser mais férteis, como resultado de uma tendência para uma maior abundância de microrganismos testados.

O solo das hortas do IPB apresenta um pH próximo da neutralidade, o que poderá estar associado ao predomínio de bactérias no solo. Contudo, não se verificou uma correlação estatisticamente significativa entre os valores de pH e a distribuição dos microrganismos.

Foram isolados vinte e dois fungos filamentosos e identificados os géneros, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Pythium* e *Rizophus*. O género *Penicillium* foi o que esteve presente em maior número. Foi encontrada uma abundância relativamente baixa de leveduras, estando presentes apenas as espécies *Rhodotorula mucilaginosa* e *Cryptococcus laurentii*.

Os produtos resultantes da actividade dos actinomicetas isolados apresentaram efeitos de inibição estatisticamente diferentes com o tipo de bactéria alvo. O maior efeito de inibição foi verificado contra as bactérias Gram positivas, destacando-se *Bacillus subtilis*.

Palavras-chave: Microbiota do solo, Hortas do IPB, Fertilidade

Abstract

Soil constitutes one of the main containers for a multitude of microorganisms. The present study took place at “hortas comunitárias” (vegetable community gardens) of Polytechnic Institute of Bragança (IPB), located in the region of Trás-os-Montes, Bragança. The soil samples were collected in January 2016, at two depths 0-10 and 10-20 cm at 10 randomly selected places. The main objective was to analyze the soil microbiota, particularly aerobic mesophilic bacteria, fungi and actinomycetes, and to evaluate the capacity of antibiotic production by Actinomycetes.

The results indicated values of fungal populations within the parameters established for a fertile soil. The same did not occur for the population of aerobic bacteria. Although they are present in the soil, they presented countings lower than the average values established for a fertile soil.

The bacterial population showed a tendency to decrease with increasing depth. This effect was not observed in the fungal population. Apparently, the soil of the lower orchards will tend to be more fertile, as a result of a tendency for a greater abundance of microorganisms.

The soil of the IPB orchards has a pH close to neutrality, which may be associated to the predominance of bacteria in the soil. However, there was no statistically significant correlation between pH values and distribution of tested microorganisms.

Twenty-two filamentous fungi were identified and the genera *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Pythium* e *Rizophus* were identified. The genera *Penicillium* was the one more present. A relatively low abundance of yeasts was found, with only the species *Rhodotorula mucilaginosa* and *Cryptococcus laurentii* being present.

The products resulted of isolated actinomyces showed statistically different inhibition effects with the target bacterial type. The highest inhibition effect was observed against Gram positive bacteria, highlighting to *Bacillus subtilis*.

Key words: Soil Microbiota, Vegetable community gardens, Fertility

CAPÍTULO 1.
INTRODUÇÃO

1. Introdução

É comum, na generalidade, sempre que fazemos uma plantação, pensar em fornecer os nutrientes necessários ao solo para que a planta cresça. No entanto, já não é tão habitual o cuidado de pensar em como está o nosso solo microbiologicamente. Cada solo é microbiologicamente diferente e a fertilidade do solo está também relacionada com a densidade populacional dos microrganismos existentes. É no solo que ocorrem grande parte das reações bioquímicas relacionadas com a decomposição da matéria orgânica e ciclo dos nutrientes.

As hortas urbanas, além dos serviços gerados como espaços verdes, surgem como alternativa no auto-abastecimento de produtos hortícolas. No entanto, o tipo de agricultura praticada pode ocasionar problemas ambientais e de contaminação dos vegetais. Os microrganismos existentes no solo são sensíveis a mudanças no solo, inclusive às práticas agrícolas. Com isso, o desafio está em conhecer a dinâmica populacional da flora microbiana de modo a obter informações sobre a qualidade do solo. De fato, ter informação sobre o estado do solo possibilita o seu manejo de forma responsável no interesse dos hortelões e da sociedade em geral. Esperamos com o nosso estudo que estes resultados possam ajudar a uma atividade agrícola mais sustentável.

Em termos de interesse pessoal, sempre nos interessamos pela atividade da agricultura urbana como atividade complementar de lazer, de convívio social e de produção sob práticas amigas do ambiente e da alimentação saudável. A isto juntamos o nosso interesse particular pelas questões e implicações da atividade microbiana nos solos e os seus efeitos na sustentabilidade dos mesmos e na produção gerada.

Este tema detém uma importância crescente na sociedade atual dado o crescente interesse pela agricultura urbana e pelas práticas sustentáveis a ela, normalmente, associadas.

Neste contexto, o presente trabalho teve como principais objetivos:

1. Avaliar a flora microbiana, em especial de bactérias aeróbias mesófilas, fungos e actinomicetas;
2. Avaliar a distribuição consoante a parcela das hortas e a profundidade de colheita;
3. Correlacionar a população microbiana com o pH do solo;

4. Isolar e caracterizar macroscopicamente e microscopicamente os fungos filamentosos;
5. Isolar, caracterizar morfológicamente e identificar por Galerias API os fungos não filamentosos (leveduras);
6. Isolar e testar a capacidade de produção de antibióticos por actinomicetas contra bactérias Gram positivas e Gram negativas.

O presente trabalho encontra-se estruturado em 4 secções distintas.

No capítulo 1 é feita a introdução da temática assim como objetivado de forma genérica o estudo.

No capítulo 2, apresentamos uma breve revisão bibliográfica em que se abordam os aspetos do solo como um habitat de organismos, a vida microbiana existente e os fatores físicos, químicos e climáticos que possam influenciar a sua presença no solo.

O capítulo 3 é destinado à explicitação do material e métodos usados, sendo descritas as metodologias utilizadas na execução do trabalho experimental e os métodos estatísticos aplicados.

No capítulo 4, referente aos resultados e discussão, apresentam-se e discutem-se os resultados obtidos, recorrendo a comparações com estudos realizados por outros autores.

Finalmente, no capítulo 5, apresentam-se as principais conclusões tendo em consideração os objetivos propostos e apontam-se sugestões de trabalhos futuros.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. Revisão bibliográfica

2.1 O solo como um corpo biológico

O solo é um “corpo vivo” colonizado por uma infinidade de organismos macro e microscópicos. Inclui formas de vida de diferentes tamanhos, geralmente classificadas em microflora (por exemplo bactérias, fungos e algas com tamanho que oscila entre 1-100 μm), microfauna (5-120 μm , como por exemplo protozoários e nematodes), mesofauna (80 μm – 2 mm, como por exemplo ácaros e colêmbolas) e macrofauna (500 μm – 50 mm, como por exemplo as minhocas e formigas) (Nannipieri *et al.*, 2003; Barrios, 2006).

Stursa *et al.* (2009), citado em Mesquita (2014), referem que “*a diversidade dos microrganismos é tão vasta quanto desconhecida*”. Estima-se que existam 1.500.000 espécies de fungos e 1.000.000 de espécies bacterianas. No entanto, apenas foi identificada 1% da população bacteriana e 1-2% das espécies fúngicas (Barrios, 2007).

As diversas populações da biota do solo estabelecem interações competitivas entre espécies, fator determinante para o carácter impar de cada solo (Gray *et al.*, 1971 citado em Moreira, 2006; Nannipieri *et al.*, 2003). A densidade, o tamanho e a atividade de toda esta comunidade de organismos é naturalmente condicionada por características edáficas e climáticas específicas de cada habitat ocupado (Figura 1) (Nannipieri *et al.*, 2003; Moreira e Siqueira, 2006).

A sua distribuição no solo não é uniforme, sendo muito dinâmica no espaço e no tempo (Tan, 1994 citado em Moreira, 2006; Turbé *et al.*, 2010). Locais com intensa atividade microbiana, estão associados à presença de matéria orgânica (Goberna *et al.*, 2007) tendendo a manter a população mais estável ao longo do ano (Mesquita, 2014).

O solo é muito heterogéneo, dinâmico e descontínuo e o estudo da sua microbiota torna-se um processo particularmente difícil (Nannipieri *et al.*, 2003). Se considerarmos que um grama de solo pode conter até 1 milhão de espécies diferentes, rapidamente nos apercebemos da enorme diversidade de microrganismos que o habitam e da magnitude do trabalho necessário para a sua simulação em laboratório (Rosselló-Mora e Amann, 2001; Moreira, 2006; Afonso, 2011).

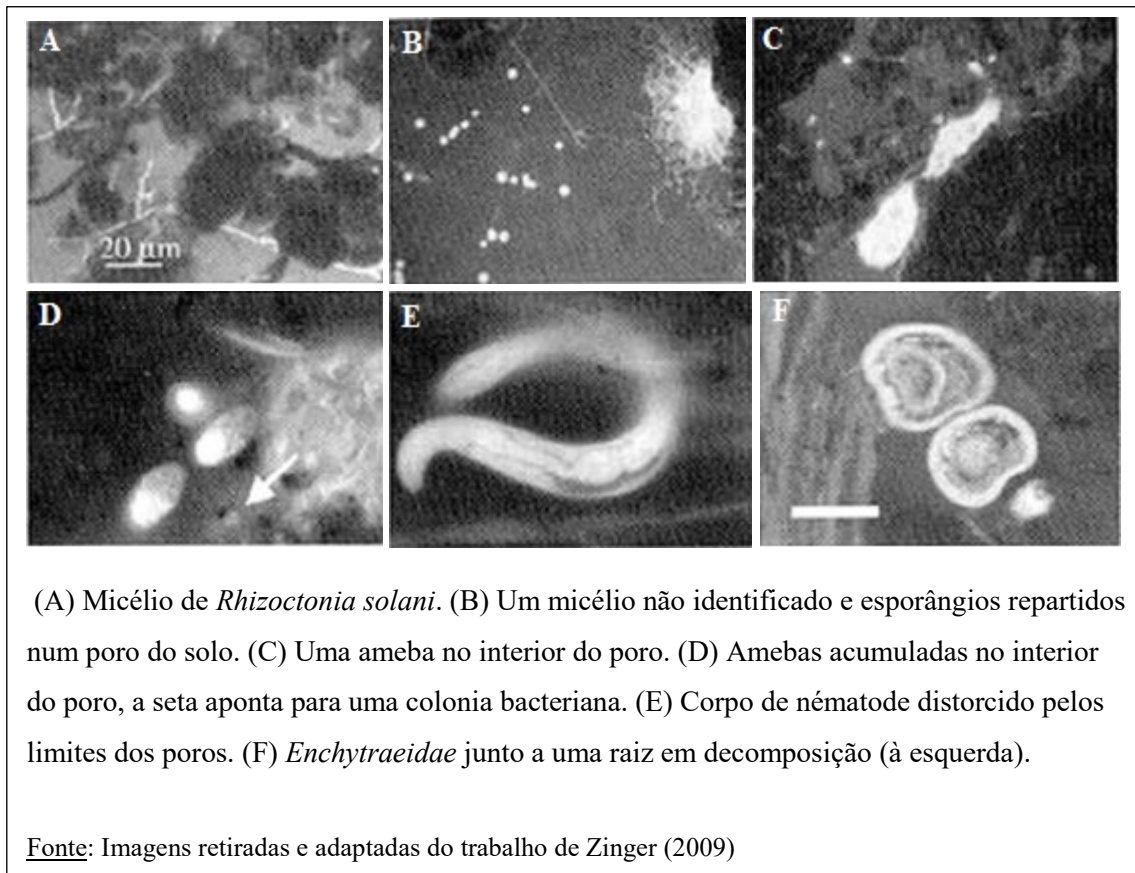


Figura 1 – Organismos do solo em seu habitat (Zinger, 2009).

2.1.1 Microbiota do solo

A microbiota do solo compreende as bactérias, fungos, actinomicetas e algas. Adicionalmente, existem também os vírus que se desenvolvem no interior de células vivas de outros organismos (Paul e Clark, 1989). Contudo, a biomassa microbiana do solo é dominada essencialmente pelas bactérias, actinomicetas e fungos (Focht e Mallin, 1979; Lavelle e Spain, 2001, citados por Djigal, 2003), pelo que nas secções seguintes apenas iremos fazer referência a estes microrganismos.

Particularmente as bactérias e os fungos têm uma influência considerável nos processos químicos do solo, sendo estes denominados por muitos autores de “engenheiros químicos”. Segundo Nannipieri *et al.* (2003), 80 a 90% dos processos que ocorrem no solo são mediados por estes microrganismos. Apresentam um forte contributo na decomposição da matéria orgânica através de reações catabólicas e anabólicas, ciclo dos nutrientes, solubilização dos minerais e degradação de resíduos tóxicos. Podem formar também relações de simbiose com as raízes das plantas, contribuir para a regulação do

ecossistema modificando a estrutura do solo e agir como antagonistas sobre os organismos patogênicos do solo (Altieri, 1999; Breure, 2004; Turbé *et al.*, 2010).

2.1.1.1 Bactérias do Solo

As bactérias representam o grupo mais abundante dos microrganismos do solo (Paul e Clark, 1989). Torsvik *et al.* (1996), citado por Nannipieri *et al.* (2003), observaram a presença de cerca de 6000 genomas bacterianos diferentes por grama de solo tendo como comparação o genoma da *Escherichia coli*, no entanto, estima-se que existam milhões de espécies bacterianas ainda não identificadas (Ewis *et al.*, 1999 citado em Moreira, 2006). A biomassa microbiana bacteriana, apesar da sua diversidade, é a menos representativa, representando entre 25% e 30% (Moreira e Siqueira, 2006).

São seres procariotas unicelulares, com formas muito diversas (cocos, bacilos, espirilos, ...) e de tamanhos reduzidos (geralmente menores do que 2 μm) (Turbé *et al.*, 2010). As paredes celulares são compostas principalmente por peptidoglicano e reproduzem-se por fissão binária, multiplicando-se, em média, num tempo de geração de 15 a 20 minutos (Paul; Clark, 1989; Brandão, 1992). A troca genética entre bactérias Gram negativo realiza-se por conjugação, envolvendo a transferência de grande quantidade de material genético em células pares, e por transdução, em que ocorre a transferência direta do DNA por bacteriófagos (vírus que atacam bactérias) (Paul e Clark, 1989).

De acordo com as fontes de energia e de carbono que utilizam, no solo podem ser encontradas bactérias autotróficas e heterotróficas. Este tipo de classificação é útil para descrever as diferenças básicas entre bactérias, tendo em conta o aspeto mais importante do seu crescimento e reprodução (Paul e Clark, 1989; Moreira e Siqueira, 2006). São denominadas autotróficas aquelas que conseguem utilizar o dióxido de carbono para obter o carbono que necessitam. Estas bactérias são particularmente importantes no ciclo do azoto (Turbé *et al.*, 2010).

Bactérias do género *Rizobium* têm a capacidade de formar relações simbióticas com leguminosas, com formação de nódulos no sistema radicular. Através deste mecanismo, a planta fornece os nutrientes necessários à bactéria e esta, por sua vez, fixa o N_2 e cede o azoto reduzido (NH_3) à planta. As quantidades de azoto fixadas variam com as espécies de leguminosas. Este processo tem um papel extremamente importante no aporte de azoto nos sistemas de cultivo e pode ser considerado, genericamente, como o segundo fator

mais importante na vida da Terra. De um modo geral, segundo Schuller (2004), são fixados anualmente uma média mundial de cerca de 1,7 a 7,0 kg de azoto por hectare.

Importa referir que este mecanismo biológico de fixação do azoto, além de contribuir para a manutenção e restauração da fertilidade do solo (Giller, 2001; citado em Barrios, 2007), traz vantagens numa perspetiva ambiental, pois o excesso da utilização de adubos azotados traduz-se em problemas de poluição ambiental, bem como em benefícios do ponto de vista económico, porque a redução da utilização destes fertilizantes, os quais são necessários em grandes quantidades, resulta numa redução dos custos de produção.

As bactérias heterotróficas são aquelas que dependem do fornecimento de carbono em formas orgânicas a partir do ambiente onde estão inseridas (Paul e Clark, 1989; Buscot; Varma, 2005). A maioria das espécies conhecidas são heterotróficas e são responsáveis pela decomposição e mineralização da matéria orgânica (ciclo do carbono) (Paul e Clark, 1989).

Para além disso, as bactérias intervêm ativamente no processo de agregação do solo pela produção de metabolitos, como os polissacarídeos, que se comportam como uma espécie de cola das partículas do solo (Buscot e Varma, 2005).

Segundo Alexander (1991), citado por Moreira (2006), as bactérias mais comuns pertencem aos géneros *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Caulobacter*, *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* e *Xanthomonas*. Buscot e Varma (2005) referem também a presença de *Sarcina*, *Azosprillum* e *Mycobacteria*. *Escherichia coli* é raramente encontrada naturalmente nos solos, podendo no entanto, aparecer como contaminante proveniente de esgotos domésticos e industriais (Buscot e Varma, 2005). Embora menos representativos mas também com uma importância considerável nos ecossistemas, Oliveira (citado por Ferreira e Sousa, 1998), evidenciam a presença dos géneros *Rhizobium*, *Azotobacter* e *Nitrobacter* (Moreira, 2006).

2.1.1.2 Fungos do solo

Os fungos são os principais constituintes da microbiota do solo. Estima-se que a sua biomassa possa representar 11 a 90 % da biomassa microbiana (Kjoller *et al.*, 1982 em Hamdan, 2010), cerca de 37 a 184 g de micélio por m² (Thorn *et al.*, 1997 em Hamdan, 2010).

São organismos heterotróficos, com uma organização celular do tipo eucariota, aeróbios, embora alguns consigam sobreviver em solos compactados com baixos teores de oxigénio (Moreira e Siqueira, 2006). Desenvolvem-se mediante a formação de filamentos finos e de diâmetro uniforme denominados por hifas. O conjunto das hifas emaranhadas forma o micélio (Lacasse, 1995). As hifas podem ser septadas ou asseptadas e comumente multi-nucleadas (Paul e Clark, 1989).

Os fungos são classificados segundo o seu processo de reprodução. Durante o seu ciclo de vida esta é realizada mediante a formação de esporos sexuais ou assexuais (Hoorman, 2011). Na reprodução assexuada não ocorre união dos núcleos sendo as frutificações asseguradas principalmente por esporângios, que são espécies de sacos onde é produzido um grande número de esporos que, ao atingir a maturidade rebenta libertando milhares de esporangiósporos, e por conidiósporos localizados na extremidade das hifas designadas por conidióforos (Lacasse, 1995). Na reprodução sexual, são essencialmente produzidos os zigósporos, ascósporos e basidiósporos a partir da conjugação das hifas em estruturadas denominadas respetivamente por, gametângios, ascos e basídios (Moreira e Siqueira, 2006).

Os fungos pertencem ao Reino Fungi que compreende 5 filos - *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota* e *Glomeromycota* (Moreira e Siqueira, 2006).

Os Chytridiomycota caracterizam-se pela produção de zoósporos uniflagelados polarmente (Paul e Clark, 1989; Moreira e Siqueira, 2006), encontrando-se especialmente em solos húmidos (Encyclopædia Britannica, 2008). Os Zygomycota possuem um micélio asseptado e unicelular (Buscot e Varma, 2005), com produção de esporângios na reprodução assexuada e zigósporos na reprodução sexual (Buscot e Varma, 2005). As espécies pertencentes de Zygomycota fermentam diversos substratos ricos em hidratos de carbono, sendo por este motivo denominadas também por “*Sugar Fungi*”. São na maioria saprófitas, no entanto alguns são fitopatogénicos ou parasitas de outros fungos (Paul e Clark, 1989; Moreira e Siqueira, 2006). Os Ascomycota apresentam um micélio septado, em que ocorre a formação de ascos na reprodução sexual levando à produção de

ascósporos (muitas vezes quatro ou oito), ou formação de conídios na reprodução assexuada (Buscot e Varma, 2005; Moreira e Siqueira, 2006). Viebahn *et al.* (2005), citado por Handan (2010), consideram que os fungos predominantes nos solos agrícolas pertencem a este grupo. Os *Basidiomycota* contêm hifas septadas e aqui, os esporos sexuais (basidiósporos), são produzidos por meiose numa estrutura especializada denominada por basídio (Paul e Clark, 1989). Os *Glomeromycota* caracterizam-se pela capacidade em estabelecer simbioses com organismos fotossintéticos (plantas, algas e cianobactérias) (Moreira e Siqueira, 2006). Apresentam hifas asseptadas e reproduzem-se assexuadamente pela produção de glomerosporos (Schüßler *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2007).

Estudos baseados em técnicas moléculas (Elmhote e Labouriau, 2004; Viebahn *et al.*, 2005; Vujavonic *et al.*, 2007, citados em Handan, 2010) demonstraram que as espécies fúngicas dominantes no solo pertenciam aos géneros *Fusarium*, *Nectria*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Chaetomium* e *Verticillium*.

O número de leveduras existentes no solo é relativamente baixo, tendo sido já isoladas *Saccharomyces* e *Candida* (Buscot e Varma, 2005).

Os fungos filamentosos do solo merecem especial destaque no que respeita à degradação da matéria orgânica, sendo os organismos mais eficientes, incorporando cerca de metade dos nutrientes disponíveis nos materiais que decompõem. São capazes de degradar compostos orgânicos muito complexos como a celulose, hemicelulose e lignina (Lavelle e Spain, 2001 citados em Djigal, 2003).

São importantes agentes no controlo de pequenos animais como nemátodes e amebas (Turbé *et al.*, 2010). Certos fungos formam relações simbióticas mutualísticas com plantas (micorrizas) contribuindo para o fornecimento de água e nutrientes (Finlay, 2004). Têm também uma ação anti-fúngica, evitando doenças na raiz associadas ao ataque de fungos patogénicos como o *Fusarium spp.*, mediante a produção de substâncias anti-fúngicas e pela barreira física que proporcionam nas raízes da planta. Contudo, nem sempre a ação dos fungos é favorável. Alguns são fitopatogénicos e outros têm a capacidade de produzir substâncias tóxicas, como por exemplo a aflotoxina de *Aspergillus flavus*, que provocam intoxicações no Homem aquando da sua ingestão em produtos contaminados (Varenes, 2003 citado em Moreira, 2006).

As hifas de fungos micorrízicos arbusculares desempenham um papel chave na formação e estabilização dos agregados do solo (Sousa *et al.*, 2012) (Figura 2) pela produção de uma glicoproteína denominada glomalina (Buscot e Varma, 2005; Rillig and

Mummey, 2006; Sousa *et al.*, 2012) que atua como uma cola no processo de ligação das partículas (Rillig and Mummey, 2006). As suas propriedades hidrofóbicas (Rillig e Mummey, 2006) e recalcitrantes (Buscot e Varma, 2005) contribuem para a estabilidade do solo, pelo efeito protetor e neutralizante que induz contra forças destrutivas (Figura 2) (Six *et al.*, 2004; Barrios, 2007).

Normalmente, os fungos predominam em solos ácidos, embora também possam estar presentes em solos neutros ou alcalinos. Isto, principalmente porque solos ácidos não são ambientes propícios para o desenvolvimento de bactérias. Todos os fatores ambientais que influenciam a distribuição de bactérias também influenciam a flora fúngica dos solos. No entanto, sendo que o teor em matéria orgânica está relacionado com o número de fungos, a diferença está na qualidade e quantidade de matéria orgânica.

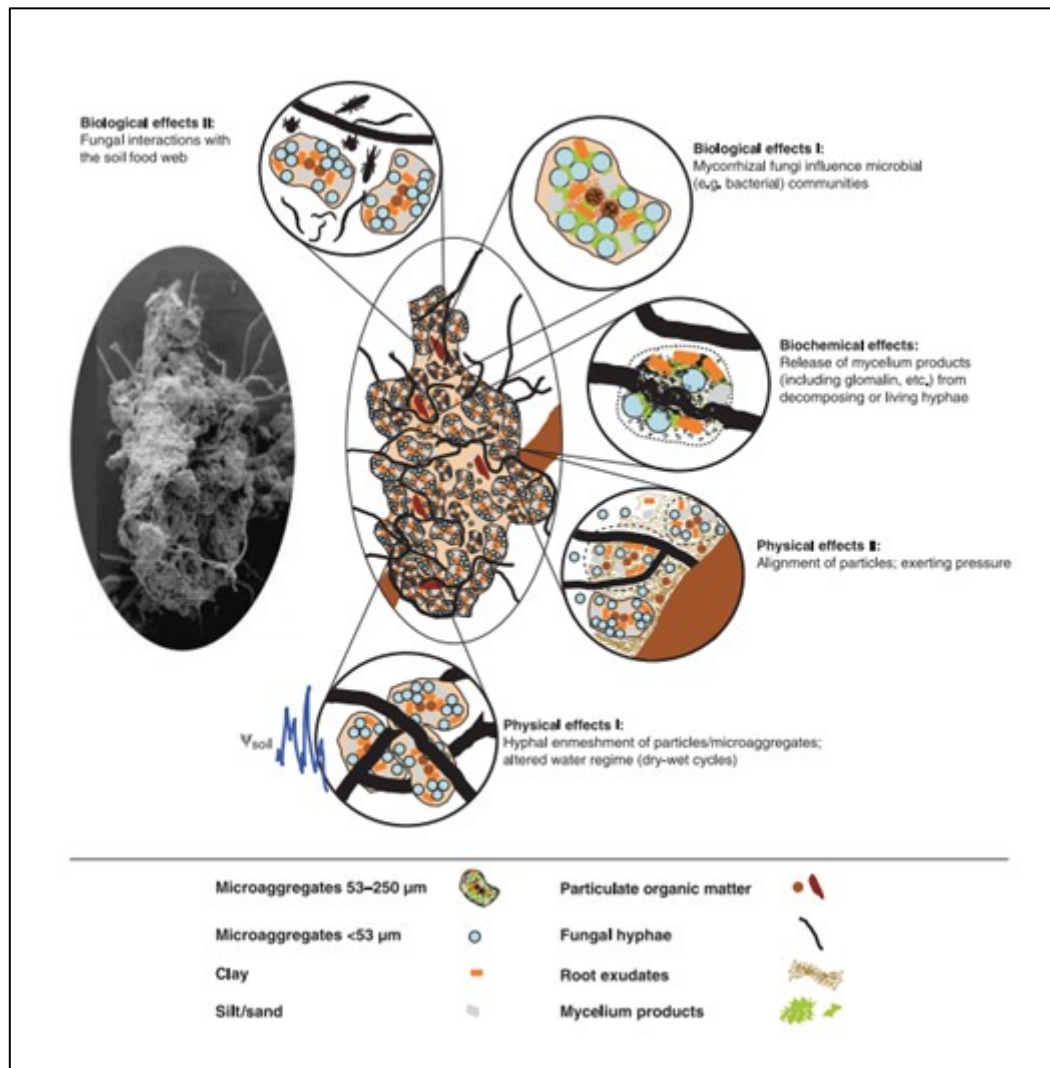


Figura 2 – Hifas fúngicas envolvidas no processo de formação e estabilização dos agregados do solo.

Fonte: Rillig e Mummey, 2006

2.1.1.3 Actinomicetas

Actinomicetas ou Actinobactérias são bactérias Gram-positivas, heterotróficas, saprófitas e de vida livre, abundantemente presentes no solo, especialmente na rizosfera (Rahman, 2011; Lins, 2014). Estima-se que cada grama de solo contém $10^6 - 10^9$ de células destes microrganismos (Casal *et al.*, sd). Morfologicamente são muito diversas, variando conforme o gênero. Podem-se encontrar como esporos esféricos ou bacilares, e na forma de filamentos mais ou menos ramificados (Moreira e Siqueira, 2006; Melo, 2009). Reproduzem-se por fragmentação das hifas (como *Nocardia*), fragmentando-se em várias células baciliformes e cocóides formando um novo micélio, ou pela formação

de esporos, nomeadamente esporangiósporos ou conidiósporos (Ventura *et.al.*, 2007 citado em Azuma, 2011).

Apresentam crescimento vegetativo na forma de micélio superficial e submerso, com hifas ramificadas com 0,5 a 2,0 µm de diâmetro. Geralmente formam colónias secas, pequenas, compactas e de crescimento lento (Lacasse, 1995; Moreira e Siqueira, 2014; Holt *et al.* citado em Corrêa, 2014). Por usufruírem de uma estrutura miceliar com esporos, inicialmente estes organismos eram classificados como fungos. Contudo, a ausência de um núcleo, a presença de um flagelo típico bacteriano, a falta de esteróis na parede celular e a sensibilidade a fagos e antibióticos anti-bacterianos, fez com que atualmente sejam classificadas como bactérias (Lechevalier, 1967 citado em Silva, 2012).

No solo, os actinomicetas participam na degradação da matéria orgânica. São notáveis pela sua capacidade de produzir uma diversidade de enzimas extracelulares que lhes permitem degradar todo o tipo de compostos orgânicos, como fenóis, quitina e parafinas, não decompostos por fungos e bactérias, bem como outras macromoléculas complexas comumente encontradas no solo como caseína, amido, húmus e lignocelulose (Lacasse, 1995; Osaki, 2008). Contribuem para a manutenção da estrutura do solo (Kennedy, 1999 citado por Aouar, 2012) e, algumas espécies, como as pertencentes do género *Frankia*, estabelecem relações de simbiose com as plantas, formando nódulos nas raízes o que lhes permite fixar o azoto atmosférico. (Moreira e Siqueira, 2006). Para além disso, estes microrganismos têm a capacidade de produzir antibióticos, o que os torna extremamente importantes no controlo do equilíbrio microbiológico do solo. Mazzola (2002), citado por Aouar (2012), refere que a riqueza em actinomicetas no solo se traduz num aumento da capacidade em eliminar microrganismos patogénicos presentes do solo.

O género mais representativo de actinomicetas do solo é *Streptomyces*, representando entre 50% (Rahman *et al.*, 2011) e 90% (Paul e Clark, 1989) do total de actinomicetas no solo. Selman Waksman, um microbiologista do solo, descobriu a estreptomicina, um antibiótico antibacteriano produzido por actinobactérias, o qual lhe conferiu o Prémio Nobel de Medicina em 1942 (Paul e Clark, 1989). Atualmente, 75% dos antibióticos disponíveis comercialmente são produzidos por espécies de *Streptomyces* (Moreira e Siqueira, 2006; Rahman *et al.*, 2011).

Todavia, como produzem compostos voláteis (como geosmina) com cheiro a ranço característico, a sua abundância pode torná-las indesejáveis. É o caso da contaminação de sistemas de abastecimento de água, em que a sua presença confere um cheiro e sabor desagradável a terra ou mofo (Lacasse, 1995; Moreira e Siqueira, 2006;

Osaki, 2008). Fortuitamente, e também importantes, podem ser encontrados no solo os géneros *Nocardia*, *Micromonospora*, *Actinoplanes* e *Streptosporangium* (Prescott *et al.*, 1996; Subba Rao, 1997, citados em Buscot e Varma, 2005).

A população de actinomicetas no solo aumenta na presença de matéria orgânica em decomposição. São na maioria microrganismos aeróbios e não toleram pH baixo, pelo que em solos ácidos e mal drenados o seu número é relativamente baixo. Crescem favoravelmente para valores de pH entre 6,5 e 8,0, diminuindo consideravelmente para valores de pH abaixo de 5,0 e temperaturas entre 25 e 30°C, embora algumas espécies termofílicas (como *Thermoactinomyces*) possam crescer a temperaturas entre 55 e 65°C (Buscot e Varma, 2005). São muito tolerantes à falta de água, pelo que solos de zonas áridas e semi-áridas tendem a apresentar maiores populações de actinomicetas. Possivelmente este facto deve-se à resistência à dessecação por parte dos esporos. Para além disso, em situações em que o teor de água existente no solo é demasiado baixo para permitir o desenvolvimento de bactérias e fungos, acredita-se que são estes microrganismos os responsáveis pela decomposição dos resíduos orgânicos (Buscot; Varma, 2005).

2.2 Características do solo como um habitat

Por definição, o solo é a “*camada delgada de material não consolidado que cobre a superfície da crosta terrestre*” (Mateus, 2008). A sua formação resulta da ação de um conjunto de fatores, nomeadamente clima, material de origem (rocha-mãe), organismos, relevo e tempo de formação. A combinação destes fatores explica a existência de diferentes tipos de solo com propriedades únicas (Coleman, 2013).

O solo é composto por três fases: sólida, líquida e gasosa. A fase sólida constitui a matriz do solo e é composta por matéria mineral e orgânica (microrganismos e substâncias húmicas) que interagem entre si formando um conjunto de partículas de diferentes tamanhos designados por agregados (Raimundo, 2003; Mateus, 2008). A fase sólida é a mais estável e a mais representativa, representando 50% (v/v) da sua composição, em condições ideais. As fases líquida e gasosa situam-se nos poros do solo (espaços vazios) e, são constituídas por água, minerais dissolvidos e por gases, respetivamente. Cada um com constituintes representa 25% (v/v) da composição do solo (Raimundo, 2003; Moreira e Siqueira, 2003, Mateus, 2008).

A estrutura agregada do solo proporciona microambientes heterogêneos resultantes da interação de características biológicas, físicas e químicas (Wallenius, 2011).

2.2.1 Aspectos físicos do solo e relação com a microbiota

2.2.1.1 Textura do solo

A textura corresponde à proporção de partículas minerais com diâmetro inferior a 2 mm, nomeadamente areia (0,02 mm), limo (0,002 mm) e argila (< 0,002 mm). Dependendo da quantidade destas partículas, os solos são classificados de arenosos, limosos ou argilosos. Podem também ser denominados de francos quando as partículas aparecem em proporções equilibradas (Arrobas e Pereira, 2010). A textura do solo influencia significativamente a taxa de infiltração e armazenamento da água, bem como a capacidade de troca de cátions e aniões. A capacidade do solo para reter a água é um fator extremamente importante porque os microrganismos dependem dela como solvente para os seus constituintes celulares e como meio onde existem os nutrientes dissolvidos. Para além disso, a sua presença facilita a mobilidade de certos organismos como as bactérias flageladas (Thies and Grossman, 2006).

2.2.1.2 Estrutura do solo

A estrutura do solo descreve a organização tridimensional das suas partículas, ou seja, o modo como as partículas (areia, limo e argila) se arranjam em agregados (Arrobas e Pereira, 2010; Afonso, 2011). A formação dos agregados inicia-se quando a microbiota e as raízes das plantas produzem filamentos e compostos mucilaginosos, como polissacarídeos altamente viscosos, que atuam como um cimento moldando o solo em agregados (Paul e Clark, 1989; Moreira e Siqueira, 2006). Os agregados formados podem variar de tamanho sendo classificados como macro (diâmetros entre 50-250 µm) e microagregados (< 2 mm) (Paul e Clark, 1989).

A estrutura influencia a atividade microbiana por condicionar a distribuição da matéria orgânica (Lavelle e Spain, 2001, Turbé *et al.*, 2010). A matéria orgânica de um solo tem origem em tecidos vegetais e em seres vivos em vários estádios de decomposição, em virtude da atividade da biofauna do solo. Representa o principal recurso de nutrientes, nomeadamente azoto, fósforo e enxofre, e fonte de energia a partir de compostos de carbono. A disponibilidade dos nutrientes é determinada pelo tipo e quantidade de matéria orgânica existente no solo (Bot e Benites, 2005). Os organismos

do solo utilizam também, a matéria orgânica para ligar as partículas em agregados, modificando a estrutura do solo e criando novos habitats (Bot e Benites, 2005). Uma outra particularidade é que, a ocorrência de intensa atividade biológica está associada à presença de matéria orgânica, constituindo muitas vezes os *hot-spots* (Nannipieri *et al.*, 2003). Segundo Nannipieri *et al.* (2003), existe uma correlação positiva entre o conteúdo de carbono orgânico e a biomassa microbiana. Para além disso, o mesmo autor refere que a matéria orgânica pode ainda adsorver compostos tóxicos produzidos pelos microrganismos.

Adicionalmente, um solo com uma boa estrutura é geralmente bem drenado, apresentado uma adequada circulação da água e trocas gasosas. Este tende a ser mais produtivo e mais favorável para o crescimento de populações aeróbias (Thies e Grossman, 2006; Arrobas e Pereira, 2010).

2.2.1.3 Espaço poroso

O espaço poroso corresponde aos espaços vazios, denominados de poros, que não estão ocupados por material sólido (Nimmo, 2013). Esta fracção é função da textura e estrutura do solo (Paul 2007, 2015).

A habitabilidade do solo depende da distribuição e arquitectura dos seus poros (Paul, 2015); teor de água existente (Thies and Grossman, 2006), circulação do ar (aeração) e presença de substratos. Estas condições determinam a acessibilidade, tipo e abundância da microflora (Paul e Clark, 1989; Turbé *et al.*, 2010).

O espaço poroso inclui dois tipos de poros, macro e microporos (Arrobas e Pereira, 2010). Os macroporos são poros com diâmetros $\geq 10 \mu\text{m}$ (Paul, 2015) e são responsáveis pela aeração e movimentação da água. Segundo Paul (2007, 2015), as raízes das plantas e alguns organismos do solo como as minhocas, contribuem para a formação de macroporos levando-os a formar um outro tipo de poro denominado de “bioporo”. De acordo com este autor, os bioporos são os habitats ideais para a microbiota do solo. São revestidos de argila, ricos em matéria orgânica e proporcionam extensos canais ao longo do solo. Os microporos são poros pequenos de diâmetros $< 10 \mu\text{m}$. São importantes na retenção de água e no fornecimento de um habitat aquoso para os microrganismos. Poros com tamanhos $\leq 5 \mu\text{m}$ limitam o acesso a nutrientes e difusão de exoenzimas, consequentemente maior parte dos microrganismos não se multiplicam neste espaço (Paul, 2015).

As bactérias distribuem-se em micro-colônias, concentrando-se irregularmente nos espaços porosos de menor dimensão e entre os agregados do solo (Paul e Clark, 1989; Moreira e Siqueira, 2006; Turbé *et al.*, 2010; Wallenius, 2011). A sua dispersão depende do movimento da água nos poros, crescimento radicular, atividade do solo e presença de outros organismos (Lavelle e Spain, 2001). Os fungos filamentosos ocupam poros maiores formando longas redes de filamentos ramificados (Paul e Clark, 1989; Moreira e Siqueira, 2006; Wallenius, 2011). As actinomicetas habitam entre as aberturas dos agregados do solo (Cresswell *et al.*, 1992 citado em Baker, 1997).

Embora haja bastante espaço disponível no solo, o que é atualmente ocupado por microrganismos representa uma pequena proporção, menos que 5% do volume total do solo (Ingham *et al.*, 1988 citado em Nannipieri *et al.*, 2003).

2.3 Influência das propriedades químicas do solo

A atividade biológica do solo é fortemente afetada pelas suas propriedades químicas, decorrentes do pH, aeração, concentração de nutrientes, gases, teor de água e salinidade (Thies and Grossman, 2006).

O pH mede a atividade do ião hidrogénio existente numa solução aquosa de solo. Dessa forma, fornece informação da acidez ou alcalinidade do solo, estando os solos ácidos associados a valores de pH inferiores a 7 e os solos alcalinos a valores superiores a 7 (Arrobas e Pereira, 2010). O pH de um solo depende do tipo de material que lhe deu origem, sendo influenciado pelo grau de fertilização, precipitação e exportação de bases de troca pelas plantas (Leite e Araújo, 2007).

Dependendo da tolerância dos microrganismos ao pH, estes são classificados em insensitivos ou indiferentes (toleram uma ampla faixa de pH), neutrófilos (intolerantes à acidez ou alcalinidade), acidófilos (crescimento favorável em condições ácidas) e basófilos (crescem melhor em condições alcalinas) (Moreira e Siqueira, 2006).

O pH do solo influencia as reações microbianas. Um exemplo, o processo de nitrificação é dos mais sensíveis ao pH (Paul e Clark, 1989). Para além de influenciar a atividade dos microrganismos, esta característica afeta diretamente a solubilidade (FAO, 2016), a disponibilidade dos nutrientes (Arrobas e Pereira, 2010) e a atividade enzimática (Paul, 2015). Em situações de elevada acidez (pH < 5,5) ocorre toxicidade do alumínio e manganês comprometendo a atividade biológica (FAO, 2016). O aumento da concentração do alumínio, por exemplo, afeta negativamente a germinação e o

crescimento de esporos de fungos micorrízicos. Para além disso, a acidez induz a inibição das enzimas das células bacterianas e desnaturação de proteínas (Moreira e Siqueira, 2006).

Todos os organismos vivos do solo necessitam de nutrientes para a sua sobrevivência. Grande parte da fauna do solo satisfaz as suas exigências nutricionais pelo consumo de outros organismos (predação). Os microrganismos nutrem-se a partir dos minerais (que solubilizam para adquirir os nutrientes necessários) ou da atmosfera do solo. A atmosfera do solo integra os gases resultantes da actividade biológica, como o óxido de azoto e, os mesmos gases encontrados no ar, tais como Azoto (N_2), Oxigénio (O_2) e Dioxido de Carbono (CO_2) (Paul e Clark, 1989).

A energia adquirida pelos microrganismos do solo advém da remoção de electrões de substâncias orgânicas ou inorgânicas (Paul e Clark, 1989). Este processo denomina-se potencial de oxidação-redução e influencia a actividade (Paul, 2015) e predominância das espécies microbianas no solo (Moreira e Siqueira, 2006). O oxigénio (O_2) é o aceitador de electrões mais comum (Moreira e Siqueira, 2006). Em situações em que o O_2 não se encontra disponível, o NO_3^- , Fe^{3+} , Mn^{2+} e SO_4^{2-} funcionam como aceitadores alternativos (Paul e Clark, 1989).

Mudanças na salinidade do solo podem alterar a actividade microbiana. A influencia pode ser directa, alterando a fisiologia microbiana, ou indirecta, mediante a modificação da solubilização da matéria orgânica e disponibilidade dos nutrientes. Geralmente, estas alterações ocorrem perto da superfície do solo, onde existe maior teor de matéria orgânica e, cumulativamente, actividade microbiana superior (Turbé *et al.*, 2010). Os sais mais comuns são combinações de cationes sódio, cálcio, magnésio e potássio, bem como os aniões cloro, sulfato e carbonatos (FAO, 2016).

Convém salientar que, existem microrganismos halofílicos que apresentam tolerância a sais (Moreira e Siqueira, 2006). Para além disso, embora a maior parte das vezes um aumento da salinidade provoque um efeito negativo sobre a sobrevivência e capacidade osmótica dos microrganismos, é possível que em condições específicas a matéria orgânica seja mais solúvel em solos com salinidade alta, e conseqüentemente o aumento de nutrientes disponíveis reduza os efeitos do *stress* osmótico sobre os microrganismos (Turbé *et al.*, 2010).

2.4 Influência das condições ambientais

Todos os processos biológicos são influenciados pela temperatura, sendo o fator ambiental o mais importante no crescimento e atividade microbiológica dos solos (Turbé *et al.*, 2010; Paul, 2015). Cada microrganismo tem um intervalo específico de temperatura, no entanto a temperatura ambiental que é induzida nos microrganismos, não é sempre constante devido às variações sazonais (Biederbeck e Campbell, 1973). A Figura 3 mostra a resposta da atividade microbiana a diferenças de temperatura.

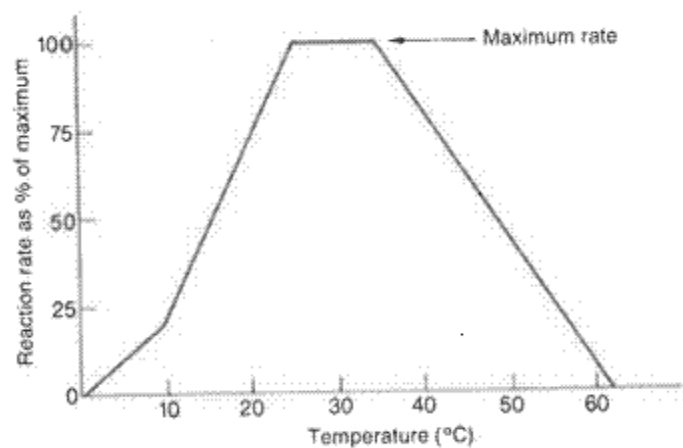


Figura 3- Taxa de reação microbiana a várias temperaturas

Fonte: Paul e Clark, 1989

Dependendo da gama de tolerância, os microrganismos são classificados como mesófilos (20-45°C), termófilos (> 45°C) e psicrófilos ($\leq 25^{\circ}\text{C}$) (Paul, 2015). A maioria deles são mesófilos, havendo duas vezes mais atividade biológica a 30°C do que a 20°C (Paul, 2015).

2.5 Caracterização da área em estudo

2.5.1 Localização

As amostras de terra foram recolhidas nas hortas comunitárias do Instituto Politécnico de Bragança (IPB) (Figura 4), localizadas em Bragança (Figura 5, A), situadas numa parcela de terreno com cerca de um hectare de área no Campus de Santa Apolónia, junto à entrada da Escola Superior Agrária (Figura 5, B) nas coordenadas 41° 47 N e 6° 45 W.

Este projeto das hortas urbanas foi desenvolvido em 2011 pela Associação Cultural e Recreativa do Pessoal do IPB, disponibilizando 38 talhões para práticas agrícolas. Uma boa resposta da população a esta iniciativa fez com que o número de hortas aumentasse, criando mais 84 talhões de modo a dar resposta à grande procura. Para usufruir de uma horta, os utilizadores pagam uma renda anual ao IPB e têm acesso gratuito a estrume e água.



Figura 4 - Hortas comunitárias do IPB.

Fonte: Fotografia tirada pela autora



Figura 5 - Localização geográfica da região de Bragança (A); localização das hortas comunitárias do IPB visualizada na aplicação de informação geográfica Google Earth (B)
Fonte: Imagens retiradas de <http://www.visitarportugal.pt> (A) e Google Earth (B)

2.5.2 Clima

A região de Bragança tem um clima mediterrânico, com alguma influência do regime atlântico. Caracteriza-se pelo contraste entre uma estação de verão quente e seco e uma estação de inverno chuvoso e frio. No Gráfico 1 é apresentada a variação mensal das temperaturas máximas, médias e mínimas, e da precipitação, correspondentes à normal climatológica num período de 30 anos (de 1971 – 2000).

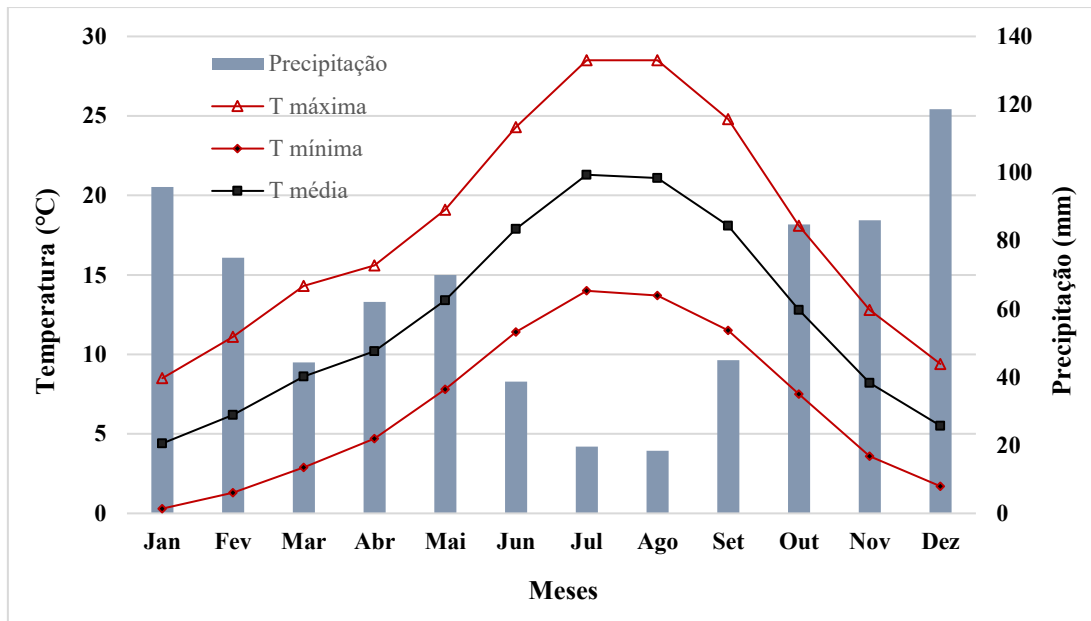


Gráfico 1 – Variação das temperaturas máxima, média e mínima e da precipitação total registadas no período de 1971 a 2000

Os meses de dezembro, janeiro e fevereiro correspondem aos meses mais frios, com temperaturas médias significativamente baixas (5,5°C, 4,4°C e 6,2 °C, respetivamente). No Outono e Inverno ocorre a maior concentração da precipitação, sendo o mês de Dezembro o mais chuvoso (118,6 mm). No Verão, a temperatura é elevada e a precipitação reduzida, sendo os meses de julho e de agosto os mais quentes e os mais secos.

2.5.3 Solo

Num estudo levado a cabo por Afonso e Arrobas (2009), em que o objetivo foi classificar os solos existentes no perímetro de Bragança, verificaram que estes solos têm predominantemente origem em rochas ricas em minerais ferromagnesianos, que são as rochas máficas e ultramáficas, geralmente peridotitos com diferentes graus de serpentinização. O solo das hortas comunitárias do IPB está classificado, segundo Lopes (2009), como cambissolo de características hidromórficas, apresentando uma textura franca.

CAPÍTULO 3
MATERIAL E MÉTODOS

3. Material e Métodos

3.1 Amostragem

As amostras de solo foram recolhidas numa única etapa, no dia 19 de janeiro de 2016, em 10 locais das hortas do IPB selecionados ao acaso: 5 locais na parcela superior (hortas de cima) e 5 locais na parcela inferior (hortas de baixo). Na Figura 6 pode-se observar a esquematização da localização dos pontos de amostragem. Em cada local foram amostradas duas profundidades: 0-10 cm e 10-20 cm, retiradas com o auxílio de uma sonda e transferidas para sacos estéreis devidamente identificados. No Laboratório de Microbiologia do IPB, uma parte de cada uma das amostras recolhida foi seca em estufa a 25°C para a determinação das propriedades microbiológicas e outra parte foi seca em estufa regulada a 65°C para a determinação do pH. Uma vez secas, as amostras foram crivadas, em condições de assepsia, com um crivo de malha de 2 mm e as análises efetuadas na fração isolada denominada terra fina (< 2 mm).

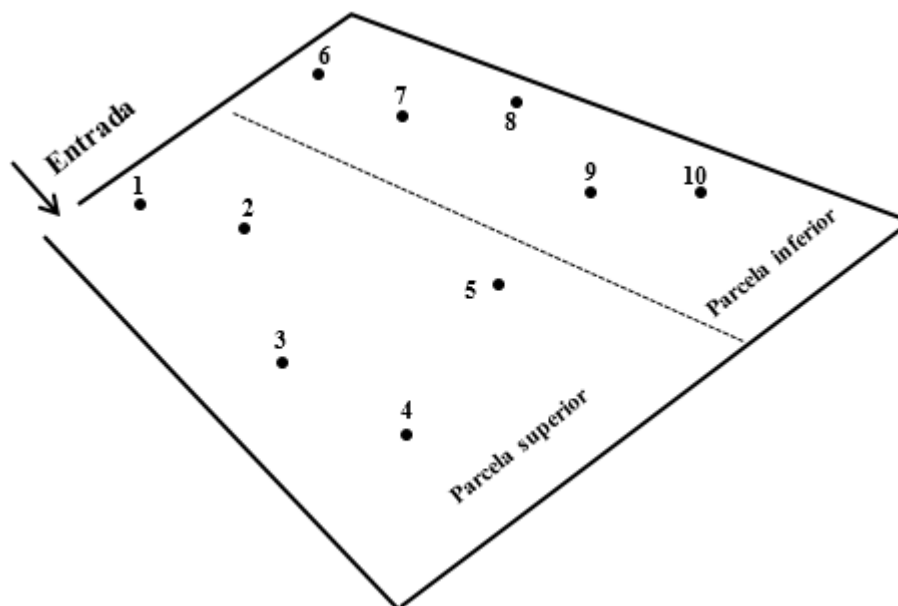


Figura 6 – Esquematização dos pontos de recolha das amostras de terra em 10 locais diferentes. Os pontos 1 a 5 correspondem à colheita na parcela superior das hortas e os pontos 6 a 10 à parcela inferior.

3.2 Avaliação da qualidade microbiológica

3.2.1 Preparação das amostras

- Para quantificação de bactérias e fungos:

Na Figura 7 apresentam-se de forma sumária as etapas utilizadas na preparação das mostras. Em condições de assepsia foram pesadas em uma balança (modelo Mettler PC 2000) massas de 10 gramas de cada amostra de solo e homogeneizadas com 90 ml de água peptonada (diluyente) previamente esterilizada. A esta solução denominou-se de “diluição Mãe”. Após 1 hora de repouso, a partir da “diluição 10^{-1} ” efectuaram-se diluições decimais sucessivas em 9 ml de água peptonada (1:10) até à “diluição 10^{-5} ”.

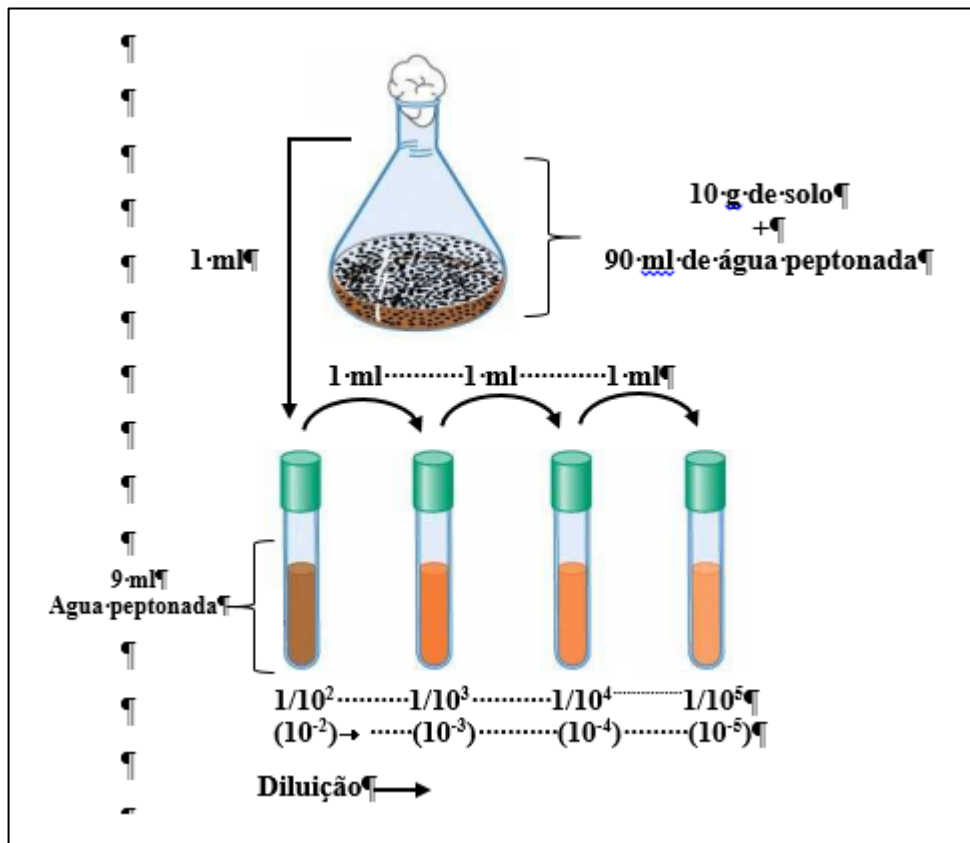


Figura 7 – Representação esquemática da preparação das amostras para quantificação de bactérias e fungos

▪ Para pesquisa de actinomicetas:

A preparação da amostra para pesquisa de actinomicetas foi feita de acordo com Casal *et al.* (sd). Misturou-se 1 grama de solo de cada uma das amostras com igual quantidade de CaCO₃ numa Placa de Petri e incubou-se à temperatura ambiente (25°C), durante 7 dias. Decorrido este tempo, preparou-se uma suspensão contendo 0,1 g da mistura solo-CaCO₃ e 100 ml de água desionizada esterilizada.

3.2.2 Meios de cultura

A composição dos meios de cultura utilizados encontra-se no Anexo I. Todos os meios de cultura foram previamente esterilizados em autoclave, a uma pressão de 15 lbs e temperatura de 121 °C durante 15 minutos.

3.2.3 Quantificação de bactérias aeróbias mesófilas

A contagem de bactérias aeróbias mesófilas foi efetuada de acordo com a norma ISO 4833:2003, utilizando o método de contagem em placa em meio *Plate Count Agar* (PCA). A sementeira foi feita por incorporação de 1 ml de cada diluição decimal e, após a distribuição do inóculo e colocado o meio de cultura, as placas foram incubadas a 37°C durante 48 horas. Decorrido este período de tempo, contaram-se as colónias presentes em cada placa, selecionando as diluições com 15 a 150 colónias. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colónias por grama de solo analisado (UFC/g_{solo}).

Os cálculos foram efetuados utilizando a seguinte fórmula:

$$UFC/g_{solo} = \frac{\sum C}{[V \times (n_1 + 0,1n_2) \times d]}$$

Onde:

$\sum C$ – soma das colónias em todas as placas contadas

V – volume de inóculo semeado em cada placa

n_1 – número de placas da primeira diluição contada

n_2 – número de placas da segunda diluição contada

d – diluição a partir da qual se obtiveram as primeiras contagens

3.2.4 Quantificação de fungos filamentosos e leveduras

Para a quantificação de fungos filamentosos e leveduras, teve-se como referencia a NP 2077. Utilizou-se o método de contagem em placa usando a técnica por espalhamento de 0,1 ml de cada uma das diluições em meio de cultura *Potato Dextrose Agar* (PDA), contendo ácido tartárico a 10%. Após incubação das placas a 25°C durante 3 a 5 dias, procedeu-se à contagem das colónias. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colónias por grama de solo analisado (UFC/g_{solo}). Os cálculos foram efetuados utilizando a fórmula descrita para o cálculo de bactérias mesófilas totais.

3.2.5 Pesquisa de actinomicetas

Procedeu-se à pesquisa de actinomicetas de acordo com o descrito em Casal *et al.* (2004), utilizando a técnica de espalhamento à superfície de 0,1ml da suspensão contendo 0,1 g da mistura solo-CaCO₃ em 100 ml de água desionizada esterilizada, em meio *Mueller Hinton Agar*. As placas foram incubadas a 28°C ± 2 °C, durante 6 a 7 dias e após este período de tempo, seleccionaram-se as placas que apresentavam colónias com morfologia típica de actinomicetas (Figura 8), expressando os resultados como presença/ausência.



Figura 8 – Aspeto de uma placa com colónias típicas de actinomicetas (setas vermelhas)

Fonte: Fotografia tirada pela autora

3.3 Isolamento de fungos filamentosos

Os fungos foram isolados em meio *Potato Dextrose Agar* (PDA). Os isolados obtidos foram caracterizados macroscopicamente e microscopicamente, de modo a identificar género.

3.3.1 Caracterização macroscópica e microscópica

As características macroscópicas foram avaliadas de acordo com a Figura 9, considerando o tamanho das colónias (diâmetro em cm), aspeto do micélio (filamentoso, aéreo ou rasteiro), textura, eventual presença de protuberância, forma, topografia, margem e cor do micélio reprodutivo.

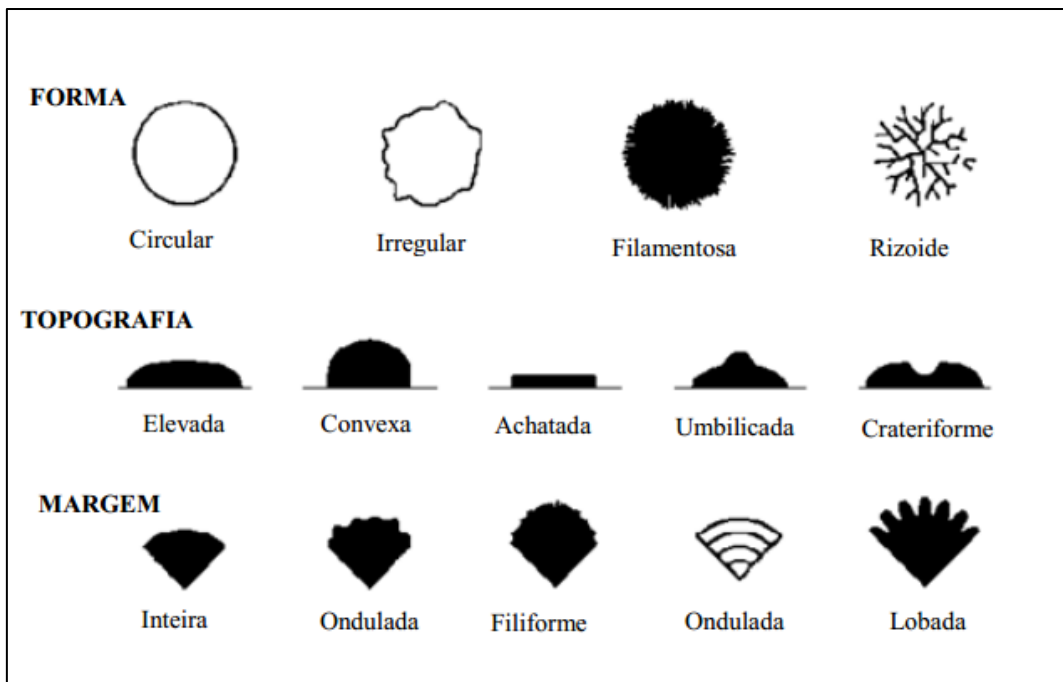


Figura 9 – Caraterísticas macroscópicas (forma, topografia e margem) de fungos em meio sólido.

Fonte: adaptado de <http://www.nios.ac.in/media/documents/dmlt/Microbiology/Lesson-51.pdf>

Para as preparações microscópicas utilizou-se o método da coloração com Azul de Algodão de Lactofenol:

- 1º – Preparou-se o corante Azul de Algodão de Lactofenol como explícito no Anexo II;
- 2º – Colocou-se uma gota de Azul de Algodão de Lactofenol sobre a lâmina;
- 3º – Retirou-se uma pequena quantidade do micélio reprodutivo e colocou-se sobre a gota de Azul de Algodão de Lactofenol;
- 4º – Cobriu-se com lamela e observou-se ao microscópico nas objectivas 10, 40 e 100 vezes.

A observação microscópica baseou-se na visualização das características mais relevantes, nomeadamente o tipo de hifas (septadas ou não septadas) e micélio reprodutivo, nomeadamente o tipo de esporos presentes (assexuados ou sexuados). A identificação do género foi baseada em bibliografia disponível na internet e no livro *Soil Microbiology and Biochemistry* de Paul e Clark, 1989.

3.4 Isolamento de leveduras

Retiraram-se as leveduras morfológicamente diferentes e isolaram-se em meio *Potato Dextrose Agar* (PDA) enriquecido com ácido tartárico a 10%, aquando da sua caracterização morfológica.

3.4.1 Caracterização morfológica de leveduras

As colónias de leveduras foram caracterizadas macroscopicamente de acordo com a metodologia proposta por Kurtzman *et al.* (2011), tendo em consideração o diâmetro, a cor, a forma, a margem, a elevação e a textura, conforme a Figura 10.

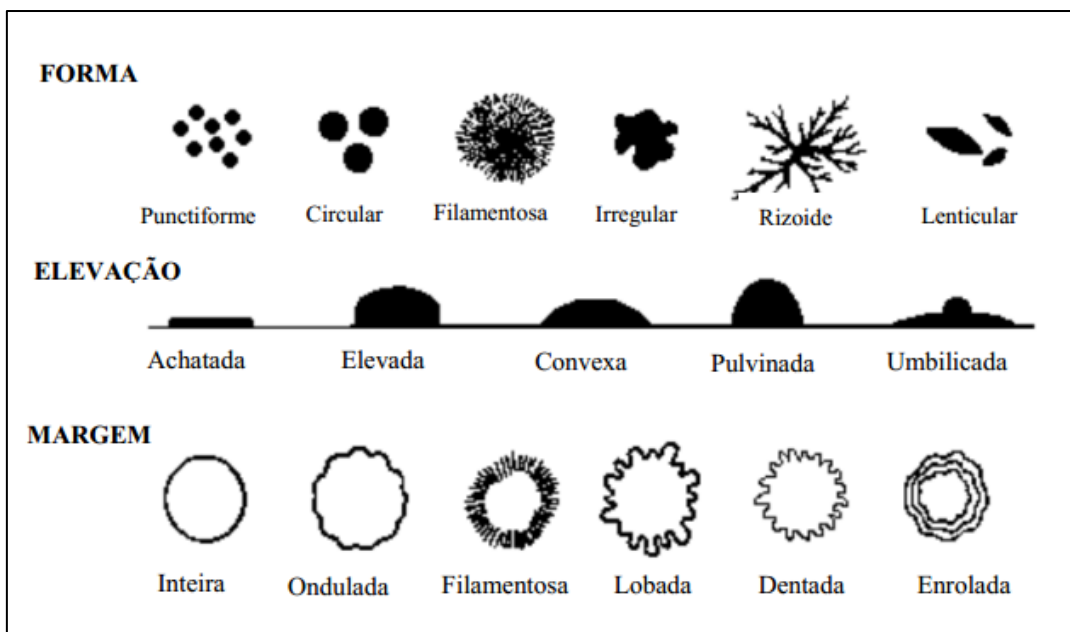


Figura 10 - Características morfológicas (forma, elevação e margem) de colônias de leveduras em meio sólido.

Fonte: adaptado de http://www.esac.pt/Abelho/MicroAmbiental/Protocolos%5B1%5D_2012_2013.pdf

3.4.2 Identificação de isolados de leveduras

Para identificação dos isolados de leveduras utilizou-se galerias API 20 C AUX (Figura 11) da empresa *BioMérieux*. Contêm 20 cúpulas: uma cúpula testemunha sem nenhum substrato (cúpula controle) e 19 cúpulas com substratos desidratados. A composição dos substratos presentes nas galerias encontra-se na Tabela 1.

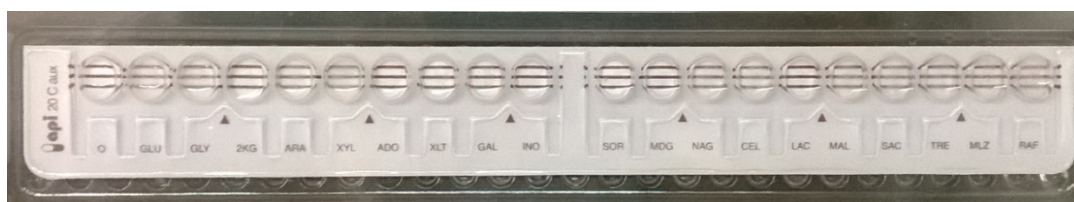


Figura 11 – Galeria API 20 C AUX

Tabela 1 – Substratos presentes nas galerias API 20 C AUX

Testes	Substratos	Quantidade (mg/cúpula)
0	Nenhum	-
GLU	D-Glucose	1,2
GLY	Glicerol	1,2
2KG	Cálcio 2-ceto-Gluconato	1,2
ARA	L-Arabinose	1,2
XLY	D-Xilose	1,2
ADO	Adonitol	1,2
XLT	Xilitol	1,2
GAL	D-Galactose	1,9
INO	Inositol	2,36
SOR	D-Sorbitol	1,2
MDG	Metil- α D-Glucopiranosido	1,2
NAG	N-Acetil-Glucosamina	1,2
CEL	D-Celobiose	1,2
LAC	D-Lactose (origem bovina)	1,2
MAL	D-Maltose	1,2
SAC	D-Sacarose	1,2
TRE	D-Trealose	1,2
MLZ	D-Melezitose	1,2
RAF	D-Rafinose	1,9

Preparou-se uma suspensão de leveduras a partir de colónias recentes com 18 a 24 horas em um tubo com 6 ml de NaCl 0,85% de opacidade 2 da Escala de McFarland. Desta suspensão transferiu-se 100 μ l para uma ampola contendo meio API C Medium (Anexo III), distribuindo depois de previamente homogeneizado, cerca de 200 μ l em cada uma das 20 cúpulas (enchendo até criar um nível ligeiramente convexo). Seguidamente as galerias foram incubadas a uma temperatura de $29 \pm 2^\circ\text{C}$ efetuando leituras nos intervalos de 48 horas e 72 horas.

Posteriormente observou-se a turbidez das cúpulas, considerando como reação positiva aquelas que se apresentavam mais turvas que a cúpula testemunha. Para a identificação das espécies utilizou-se o catálogo analítico adquirido à Empresa (Figura 12).

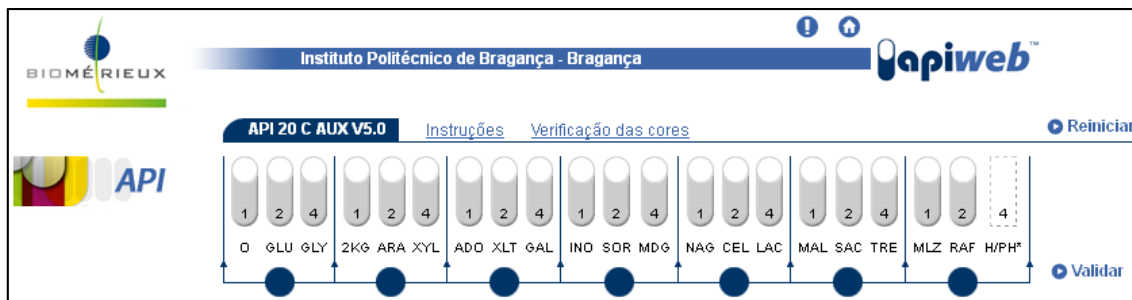


Figura 12 – Catálogo analítico *online* utilizado na identificação das espécies de leveduras através dos resultados positivos nas diferentes cúpulas da galeria. Após preenchidos os espaços, o programa é validado fornecendo a espécie correspondente

3.5 Isolamento de actinomicetas e avaliação da produção de antibióticos

Após isolamento prévio de actinomicetas em meio *Mueller Hinton Agar*, procedeu-se à avaliação da produção de antibióticos por estas bactérias. Transferiu-se, com auxílio de palitos estéreis, as colónias de actinomicetas isoladas para placas contendo meio Nutriente Agar (NA) e colocaram-se a incubar em estufa a 28 °C durante 1 a 2 dias. Decorrido este período de tempo, preparou-se independentemente quatro suspensões com as bactérias teste: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, com uma densidade óptica de 0,1. Em tubos contendo 5 ml de água desionizada esterilizada colocou-se, com auxílio de uma ansa, uma porção da bactéria teste e agitou-se no vórtex até completa dissolução.

Obtidas as suspensões bacterianas, mediu-se a sua densidade óptica a um comprimento de onda de 540 nm, usando um espectrofotómetro UV – 3100 PC. O valor da Absorvância (Abs) obtido correspondeu à Densidade Óptica da cultura 0,1.

Das suspensões bacterianas, foi transferido 0,1 ml para tubos de ensaio contendo 5 ml de meio Nutriente Agar semi-sólido à temperatura de 42 °C. Homogeneizou-se no vórtex e transferiu-se o conteúdo para as Placas de Nutriente Agar contendo as actinomicetas isoladas, rodando levemente as placas de modo a formar um tapete homogéneo à superfície. Após solidificadas, colocaram-se a incubar durante a noite a 37 °C.

No dia seguinte, registou-se a presença ou ausência de halos de inibição do crescimento de, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. O halo de inibição foi medido pela distância entre o actinomiceta isolado e a bactéria teste. A área do halo foi calculada pela área da circunferência (πR^2), expressando os resultados em mm².

3.6 Caracterização físico-química

3.6.1 Determinação do valor de pH

Os valores de pH foram determinados numa suspensão de solo contendo 10 gramas de solo suspenso em 25 ml de água destilada e em 25 ml de de KCl 1 Molar (proporção 1:2,5). Após 2 horas sob agitação ocasional, mediu-se os valores de pH das soluções, à temperatura de referência (25°C). Para o efeito foi usado um potenciômetro *Mettler Toledo LE409* (Figura 13), previamente calibrado com soluções tampão de pH = 4,00 e pH = 7,00.

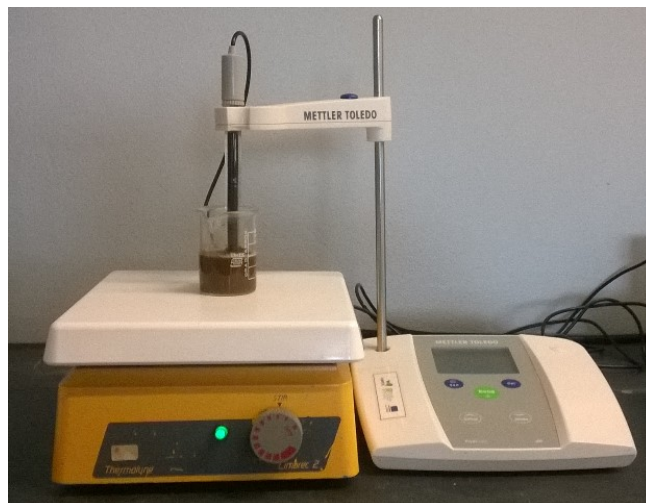


Figura 13 – Medidor de pH (*Mettler Toledo LE409*)

3.7 Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando o programa SPSS versão 23.0.

Para o estudo da avaliação microbiológica, verificaram-se primeiramente os pressupostos da distribuição normal das variáveis dependentes a partir do teste de Kolmogorov-Smirnov. Como os dados apresentaram normalidade ($p > 0,05$) utilizaram-se os testes paramétricos. Fez-se uma análise exploratória/descritiva para visualizar as médias e desvio padrão das populações de bactérias aeróbias mesófilas e fungos no total, por parcela (superior e inferior) e por profundidade (0-10 e 10-20 cm). Utilizou-se o Teste F para ver se existiam diferenças significativas nos microrganismos entre as parcelas e as profundidades, considerando-se estatisticamente significativos os efeitos para um nível de significância inferiores ou iguais a 5%.

Para avaliar se a distribuição de bactérias aeróbias mesófilas e fungos era influenciada pela interação do efeito da parcela e da profundidade, recorreu-se a uma análise univariada de variância a dois fatores (ANOVA *two-way*).

Para o tratamento estatístico dos resultados de pH em água e KCl do solo, após verificar que os dados obtidos apresentavam distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, utilizou-se o teste F para observar se existiam diferenças significativas entre as parcelas e as profundidades e fez-se uma análise da correlação de Pearson entre estes valores e as populações bacteriana e fúngica.

Para avaliar o efeito de inibição (presença/ausência) dos actinomicetas isolados contra as bactérias alvo utilizou-se o teste do Qui-quadrado por se tratarem de variáveis nominais. Para verificar se houve diferenças significativas entre as áreas dos halos de inibição, depois de estudado e verificado que as distribuições não seguiam a normalidade, recorreu-se ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido da comparação múltipla das médias das ordens para identificar qual ou quais as bactérias alvo que apresentavam halos de inibição significativamente diferentes. Consideraram-se diferenças estatisticamente significativas para um nível de significância de 0,05.

CAPÍTULO 4
RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. Resultados e Discussão

4.1 Avaliação microbiológica

Na Tabela 2 apresentam-se os resultados da microbiota encontrada no solo das hortas comunitárias do IPB, obtida a partir de amostras colhidas nas parcelas superior e inferior a duas profundidades diferentes (0-10 cm e 10-20 cm).

A população de bactérias aeróbias mesófilas predominou comparativamente à população de fungos, com contagens totais de 6,42 log UFC/g_{solo}. Contudo, considerando que para um solo fértil o valor de abundância bacteriana, segundo Oliveira (1998), citado por Moreira *et al.* (2007), se deve situar entre 1×10^8 a 1×10^9 UFC/g (= 8 log UFC/g a 9 log UFC/g), os nossos resultados encontram-se abaixo aos valores médios. A população de fungos, com 4,65 log UFC/g de contagens totais, apresenta valores dentro do estipulado pelo mesmo autor (Oliveira; 1998, citado por Moreira *et al.*, 2007), que considera como valores médios contagens entre 1×10^5 e 1×10^6 (= 5 log UFC/g a 6 log UFC/g) para um solo fértil.

Observou-se uma tendência para uma maior abundância de bactérias e fungos na parcela inferior das hortas e a 10 cm de profundidade. Contudo, estatisticamente essas diferenças não foram significativas. A parcela ($p = 0,572$ e $p = 0,756$) e a profundidade ($p = 0,078$ e $p = 0,782$) não influenciaram a distribuição destes microrganismos.

Rodrigues *et al.* (2011) ao comparar a abundância de fungos e bactérias, verificou um maior crescimento populacional de bactérias na época chuvosa e um decréscimo da população de fungos com o aumento do volume de água no solo. Walker *et al.*, (2003), citado por Borowik e Wyszowska (2016), referiram que o excesso de água no solo devido a chuvas periodicamente fortes é ameaçador para as bactérias aeróbias. Solos excessivamente secos e húmidos podem conduzir a uma diminuição da biomassa microbiana (Landesman e Dighton 2010).

A colheita das amostras de solo para este estudo foi efetuada no mês de janeiro (estação de inverno), onde ocorre, frequentemente, precipitação. No dia da amostragem, o solo estava húmido como resultado de uma precipitação regular nessa semana. Esta situação poderá ter influenciado os resultados obtidos no nosso trabalho.

Tabela 2 – Densidade populacional de bactérias e fungos (média \pm desvio padrão) e presença de actinomicetas existente no solo das hortas comunitárias do IPB

Microrganismos	Total	Parcela		Profundidade		Teste F	
		Superior	Inferior	0-10 cm	10-20 cm	Parcela	Profundidade
Bactérias aeróbias mesófilas (log ufc g ⁻¹ _{solo})	6,42 \pm 0,279	6,38 \pm 0,293	6,46 \pm 0,274	6,53 \pm 0,227	6,31 \pm 0,293	0,572	0,078
Fungos filamentosos (log ufc g ⁻¹ _{solo})	4,65 \pm 0,614	4,61 \pm 0,753	4,70 \pm 0,474	4,69 \pm 0,549	4,61 \pm 0,702	0,756	0,782
Actinomicetas	Presença	Presença	Presença	Presença	Presença		

Também, se pretendeu avaliar a distribuição de bactérias aeróbias mesófilas e fungos consoante a parcela e a profundidade a que foram colhidas as amostras de solo, bem como a existência de interação entre estes fatores. A Tabela 3 mostra os resultados obtidos da análise univariada de variância a dois fatores.

Tabela 3 – Resultados da Anova two-way à distribuição dos microrganismos consoante a parcela e a profundidade e interação entre os fatores.

Parâmetros	Factores	Sig. ⁽¹⁾	Eta ² parcial ⁽²⁾	Potência do teste ⁽³⁾
Bactérias	Parcela	0,486	0,031	10,3 %
	Profundidade	0,048	0,222	52,0 %
	Interação	0,017	0,308	70,7 %
Fungos	Parcela	0,768	0,006	59,0 %
	Profundidade	0,794	0,004	57,0 %
	Interação	0,789	0,005	58,0 %

⁽¹⁾ Sig. - Significância do teste estatístico (Nível de Significância de 5%)

⁽²⁾ Eta²parcial = muito elevado se > 0,5; elevado]0,25;0,50]; médio]0,05;0,25]; pequeno se ≤ 0,05

⁽³⁾ Probabilidade de rejeitar H₀ corretamente (quanto maior, maior é a confiança)

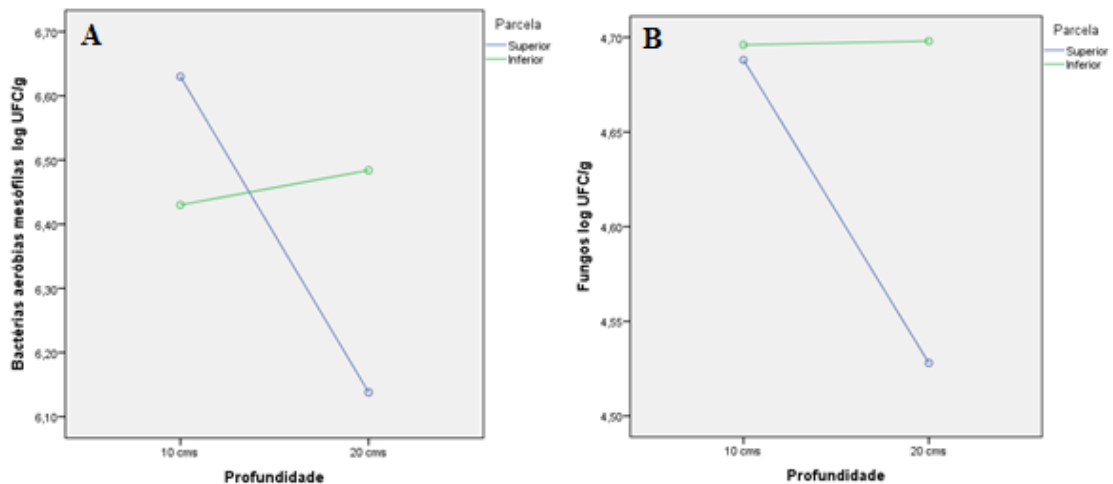


Figura 14 – Representação gráfica ilustrando a presença de interação significativa entre a parcela e a profundidade sobre a abundância bacteriana (A) e ausência do efeito de interação sobre a abundância fúngica (B)

A população bacteriana foi influenciada pelo efeito da parcela e da profundidade, como se pode observar na Figura 14. Os resultados demonstram a existência de uma interação significativa entre os 2 fatores ($p = 0,017$), sendo o efeito elevado ($\eta^2_{\text{parcial}} = 0,308$) e uma potência do teste de 70,7%. Também podemos afirmar que a profundidade teve um efeito estatisticamente significativo, no entanto de pequena dimensão ($p = 0,048$; $\eta^2_{\text{parcial}} = 0,222$; potência do teste = 52%) sobre a densidade bacteriana. Na Figura 14A podemos observar que o número de bactérias aeróbias mesófilas decresceu com a profundidade na parcela superior. Já na parcela inferior a população foi mais estável. Estes resultados sugerem que a parcela inferior poderá ser a responsável pelo efeito não significativo na distribuição das bactérias com a profundidade observado no primeiro teste (Tabela 2).

Vários investigadores (Duineveld *et al.*, 2001; Wieland *et al.*, 2001, citados em Buscot e Varma, 2005) referem que a população de bactérias diminui à medida que a profundidade do solo aumenta e que as maiores concentrações ocorreram nas camadas superficiais. Também, Fernandes (2009) ao estudar a diversidade bacteriana de amostras de solos ricos em minerais de argila verificou um decréscimo da densidade bacteriana com o aumento da distância à superfície. Resultados similares foram obtidos por Pfüller *et al.* (2016) que constataram uma maior presença de microrganismos nas camadas superiores do solo (0-5 e 5-10 cm), decrescendo com a profundidade 10-15 e 15-20 cm.

A interação entre a parcela e a profundidade sobre a abundância fúngica ($p = 0,724$) foi não significativa. Vários autores (Martinez e Ramirez, 1978; Goberna *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2011) mostraram que o número de fungos diminuía com o aumento da profundidade, provavelmente pelo facto, dos fungos filamentosos serem aeróbios obrigatórios. Neste trabalho, esse efeito não foi significativo. A população fúngica observada nas amostras recolhidas à profundidade 0-10 cm não diferiu muito da obtida a 10-20 cm. Pensamos que este comportamento poderá estar relacionado com a concentração de nutrientes e matéria orgânica do solo.

Os horticultores das hortas do IPB valorizam significativamente a fertilização orgânica mediante o uso de estrume, no qual é fornecido gratuitamente pelo IPB em quantidades ilimitadas. Como resultado, parece não haver limites nas quantidades aplicadas (Rodrigues *et al.*, 2013), convertendo-se possivelmente, em situações de excesso.

Lauber *et al.* (2008), ao estudarem o efeito das propriedades edáficas do solo nas comunidades bacterianas e fúngicas, observaram que a quantidade de bactérias era

essencialmente influenciada por mudanças de pH e textura e que as comunidades fúngicas estavam fortemente relacionadas com mudanças na disponibilidade de nutrientes do solo, associadas particularmente às concentrações de fósforo (P). Lopes (2014), ao caracterizar o solo das hortas do IPB verificou teores elevados de fósforo quer na camada a 0-20 cm (246,0 a 585,0 mg kg⁻¹) quer na camada a 20-40 cm (202,3 a 494,0 g kg⁻¹). Esta situação pode justificar o facto de não se verificarem diferenças apreciáveis no número de fungos entre as profundidades 0-10 cm e 10-20 cm. Adicionalmente, pode existir influência da adição de matéria orgânica pelos hortelões até à profundidade 20 cm e, por outro lado, fontes de energia e carbono provenientes de resíduos vegetais.

4.2 Valores de pH

Na Tabela 4 apresentam-se os resultados obtidos para o pH das amostras de solo (n=20) nas duas parcelas (superior e inferior) e nas profundidades 0-10 e 10-20 cm

Tabela 4 – Valores de pH (média \pm desvio padrão) obtidos das amostras de solo analisadas (n = 20).

pH	Total	Parcela		Profundidade		Teste F		<i>p</i> de Pearson* (Sig.)	
		Superior	Inferior	0-10 cm	10-20 cm	Parcela	Profundidade	Bactérias	Fungos
pH (H ₂ O)	6,99 \pm 0,294	6,92 \pm 0,269	7,08 \pm 0,309	7,04 \pm 0,306	6,96 \pm 0,291	0,221	0,528	0,121 (0,611)	-0,194 (0,413)
pH (KCl)	6,24 \pm 0,255	6,21 \pm 0,162	6,27 \pm 0,331	6,36 \pm 0,264	6,11 \pm 0,182	0,637	0,024	0,110 (0,643)	-0,145 (0,543)

* Correlação de Pearson. Significativa no nível 0,05

Não se observaram diferenças significativas nos valores de pH(H₂O) quer entre as parcelas ($p = 0,221$) quer entre a profundidade ($p = 0,528$). Também, as correlações entre os valores de pH e o número de bactérias ($p = 0,611$) ou fungos ($p = 0,413$) não são estatisticamente significativas. Não se verificam diferenças significativas nos valores do pH(KCl) entre as parcelas ($p = 0,637$) nem correlações estatisticamente significativas com a quantidade de bactérias ($p = 0,643$) nem de fungos ($p = 0,543$). Observa-se contudo diferenças significativas nos valores de pH (KCl) com a profundidade.

Segundo Lauber *et al.* (2008), o pH do solo permite prever a comunidade microbiana no solo. Considerando que, as hortas do IPB apresentam um pH próximo da neutralidade justifica-se a maior incidência de bactérias. Esta observação é corroborada por outros estudos. Segundo Moreira e Siqueira (2006) a maioria das bactérias crescem melhor para valores de pH entre 6 e 8 e os fungos em solos ácidos. Rech *et al.* (2013) verificaram um maior número de fungos em solos com pH de 4,3 em comparação às bactérias e o predomínio de bactérias em áreas com pH 6,6 e 6,3. Grantina *et al.* (2011) demonstraram que a abundancia fúngica em solos florestais com pH 4,46 – 5,30 foi maior comparativamente à observada em solos neutros (grupos de solo com pH 6,68 – 7,90).

4.3 Caracterização dos isolados de fungos filamentosos e de leveduras

4.3.1 Identificação macroscópica e microscópica de fungos filamentosos

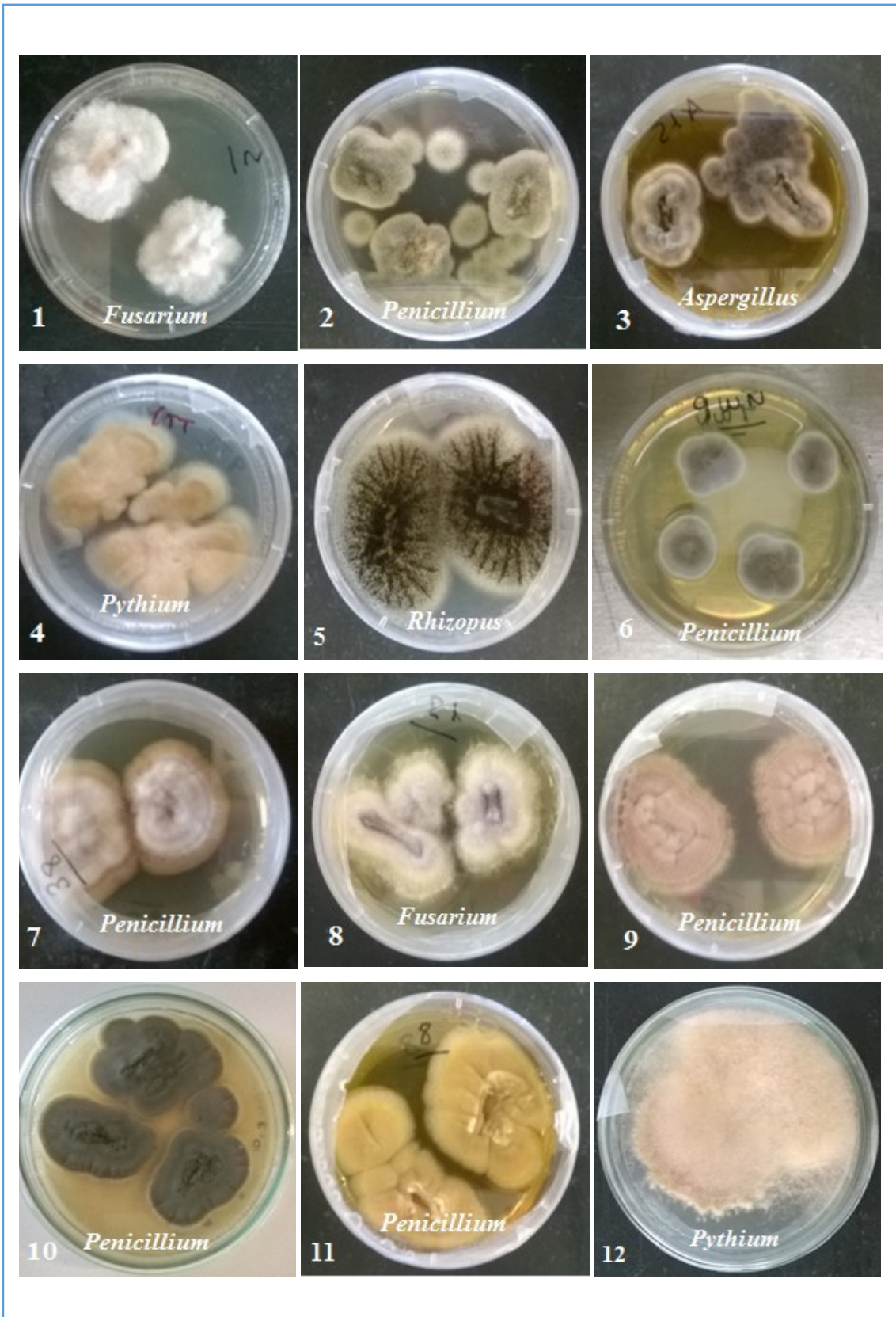
Foram isolados 22 fungos filamentosos e classificados de acordo com as características macroscópicas e microscópicas. Foram também isolados outros fungos, contudo não foram identificados porque não foi possível observar as suas estruturas de reprodução assexuada. A partir das características microscópicas foram identificados os géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Pythium* e *Rhizopus*. Na Figura 15 observa-se o crescimento em placa dos fungos filamentosos encontrados no solo das hortas do IPB e na Tabela 5 a sua caracterização morfológica.

Microscopicamente, observaram-se essencialmente as estruturas de reprodução assexuada. O género *Penicillium* foi identificado pela presença de conidióforos verticilados com formação de fiálides e conídios. Em algumas situações foi possível observar as estruturas de origem sexuada, nomeadamente os ascósporos e ascos com forma arredondada (Tabela 5, Fungos 13). *Aspergillus* observaram-se conidióforos não septados e dilatados no topo (denominado vesícula) com formação de fiálides e presença de conídios. A reprodução sexuada foi possível observar também em alguns isolados (Tabela 5, Fungos 14 e 17) com a presença de ascósporos e ascos. Tanto nos géneros *Aspergillus* como *Penicillium* os conídios tinham origem nas fiálides. *Alternaria* apresentou conídios grandes e septados transversal e longitudinalmente e de forma ovóide. *Fusarium* observaram-se conídios grandes e septados transversalmente com forma falciforme denominados de macroconídios e conídios mais pequenos também septados denominados de microconídios. Em certos fungos observou-se, por vezes, a presença de clamidospóros. *Verticillium* possui conidióforos verticilados com fiálides longas verticiladas em torno do conidióforo. *Pythium* foi caracterizado pela presença de zoósporos. Em alguns fungos deste género (Tabela 5, Fungo 12) observou-se a reprodução sexuada caracterizada pela presença de oósporos. No *Rhizopus* foram observados esporos assexuados, os esporangiósporos, produzidos no interior de esporângios com uma estrutura em forma de cabeça de alfinete. Observaram-se ainda a presença de esporos sexuados, os zigósporos.

Penicillium foi o mais abundante. Segundo a literatura, trata-se de um fungo envolvido na decomposição da matéria orgânica do solo, sendo antagonista de algumas espécies fitopatogênicas (Gomez *et al.*, 2007 citado em Borges *et al.*, 2011). Segundo Paul e Clark (1996), os fungos pertencentes ao gênero *Penicillium* são comuns no solo predominando em solos temperados. *Aspergillus* também são frequentemente encontrados no solo e na matéria orgânica em decomposição, no entanto, prevalecem nos solos tropicais (Paul e Clark, 1996). De acordo com Wakelin *et al.* (2004) e Pradhan e Sukla (2005) espécies dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* estão envolvidas no processo de solubilização do fosfato inorgânico, desempenhando um papel importante na suplementação de fósforo do solo.

Fusarium apresenta espécies patogênicas e não patogênicas (Fravel *et al.*, 2002). No entanto, é considerado por muitos autores (Alabouvette, 1999; Borrero *et al.*, 2004; Ethur *et al.*, 2008) como um agente patogênico das plantas causando podridão nas raízes. Por outro lado, Borges *et al.* (2011) referem que estes fungos, juntamente com *Aspergillus*, produzem micotoxinas que podem provocar doenças no Homem e animais.

Verticillium, *Pythium* e *Alternaria* são descritos, na sua maioria, como fungos fitopatogênicos (Pryor *et al.* 1998; Bueno, 2006;). *Rhizopus* são maioritariamente saprófitos, apesar de alguns serem fitopatogênicos e parasitas de outros fungos (Paul e Clark, 1989; Borges *et al.*, 2011).



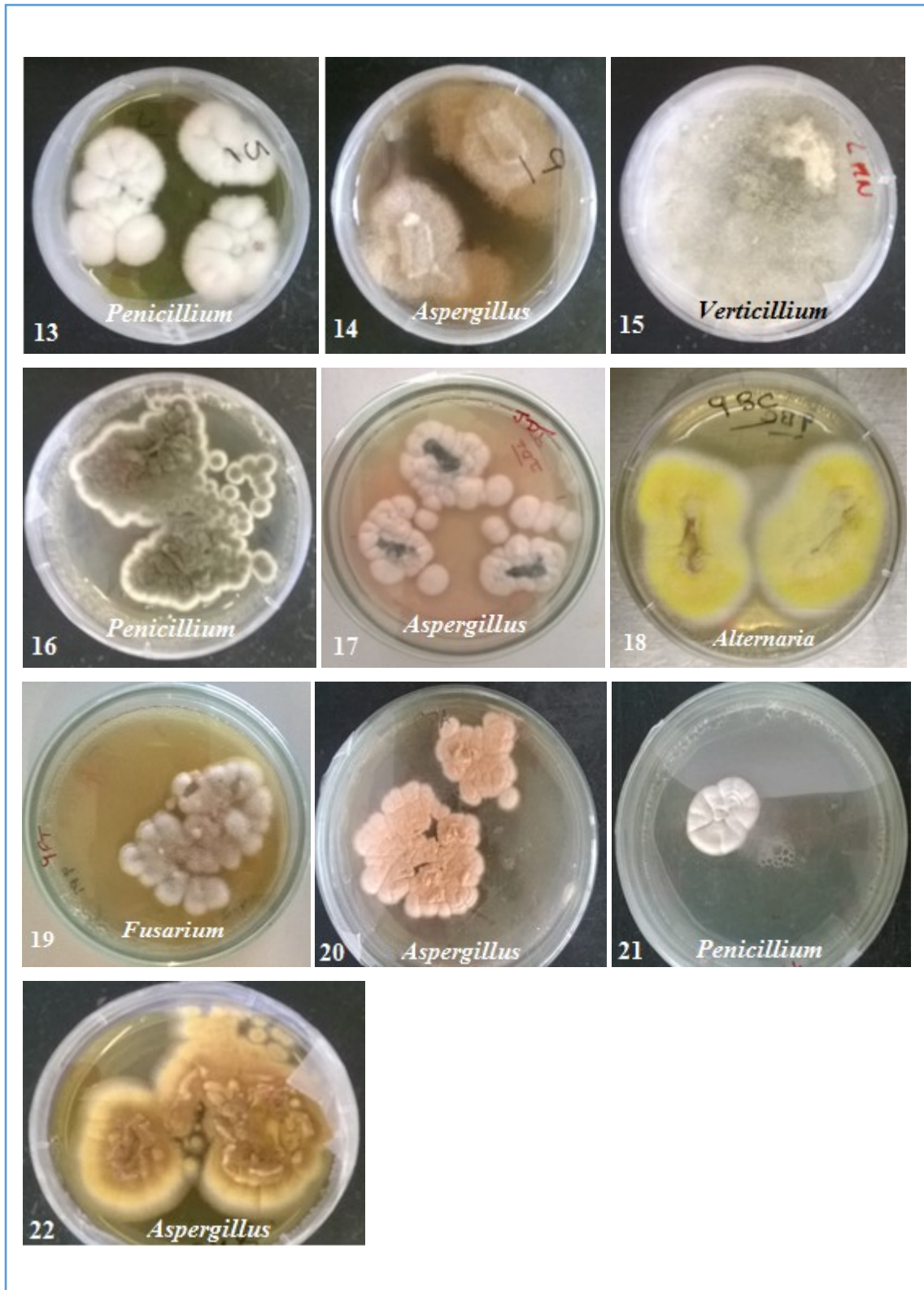


Figura 15 – Aspeto macroscópico dos fungos filamentosos isolados

Tabela 5 – Características morfológicas (macroscópicas e microscópicas) dos fungos isolados no solo das hortas do IPB.

Fungos	Características morfológicas						Gênero
	Macromorfologia			Micromorfologia			
	Diâmetro (cm)	Forma	Relevo	Rebordo	Textura	Micélio (Aspecto e cor)	
1	2,5	Filamentosa	Elevado	Filiforme	Algodonosa	Aéreo filamentosos de cor branca.	Hifas septadas. Presença de macro e microconídios. <i>Fusarium</i>
2	1,0	Circular e filamentosa	Achatado	Filiforme	Algodonosa	Filamentoso de cor verde “relva” no centro e amarelo no rebordo	Hifas septadas. Conidióforo verticilado com formação de fiálides e presença de conídios. <i>Penicillium</i>
3	2,3	Irregular	Elevada	Filiforme	Penugenta	Filamentoso com centro cinzento-escuro passando para branco no rebordo.	Hifas septadas. Conidióforo não septado e dilatado no topo (vesícula) com formação de fiálides e presença de conídios. <i>Aspergillus</i>
4	3,1	Irregular	Achatada	Filiforme	Granulosa	Rasteiro de cor castanho creme.	Hifas não septadas. Esporângios e zoósporos flagelados. <i>Pythium</i>
5	4,1	Filamentosa	Achatada	Filiforme	Granulosa	Aéreo com esporos pretos sobre uma base amarelo acastanhado claro	Hifas não septadas. Esporangióforos e esporângios. Presença de zigósporos <i>Rizophus</i>
6	1,6	Circular	Achatada. Com protuberancia	Ondulada	Penugenta e pragueada	Filamentoso de cor cinzento-escuro, modificando a cor do meio de cultura para amarelo queimado	Hifas septadas. Conidióforo verticilado com formação de fiálides e presença de conídios. Presença de ascósporos e ascos. <i>Penicillium</i>

7	3,0	Rizóide	Convexa	Rizóide	Centro Algodonoso com rebordo arenoso	Filamentoso com centro lilás passando para uma bordadura branco neve e finalizando com uma margem de esporos lilás.	Hifas septadas. Conidióforo verticilado com formação de fiálides e presença de conídios.	<i>Penicillium</i>
8	2,7	Rizóide	Convexa	Filiforme	Algodonosa	Filamentoso com centro lilás passando a branco neve no rebordo	Hifas septadas. Presença de macro e microconídios.	<i>Fusarium</i>
9	2,9	Filamentosa	Achatada	Filiforme	Arenosa	Rasteiro de cor lilás passando para lilás mais claro no rebordo	Hifas septadas. Conidióforo verticilado com formação de fiálides e presença de conídios.	<i>Penicillium</i>
10	2,2	Circular	Achatada	Filamentosa	Aspecto seco. Granulosa	Rasteiro de cor verde-escura	Hifas septadas. Conidióforo verticilado com formação de fiálides e presença de conídios.	<i>Penicillium</i>
11	4,0	Irregular	Achatada	Filiforme	Arenosa	Rasteiro de cor castanho chocolate	Hifas septadas. Conidióforo não septado e dilatado no topo (vesícula) com formação de fiálides e presença de conídios.	<i>Aspergillus</i>
12	8,0	Rizóide	Elevada	Filiforme	Algodonosa	Aéreo de cor branco passando a beije com envelhecimento	Hifas não septadas. Zoósporos. Presença de oósporos.	<i>Pythium</i>
13	2,3	Filamentosa	Elevada	Filiforme	Cotonosa	Rasteiro de cor branco Neve	Hifas septadas. Conidióforo verticilado com formação de fiálides e presença de conídios. Presença de ascósporos e ascos.	<i>Penicillium</i>
14	3,5	Rizóide	Achatada	Filiforme	Arenosa	Rasteiro de cor castanha/bronze	Hifas septadas. Conidióforo não septado e dilatado no topo (vesícula) com	<i>Aspergillus</i>

							formação de fiálides e presença de conídios. Presença de ascósporos e ascos	
15	5,0	Filamentosa	Achatada	Filamentosa	Algodonosa	Rasteiro de cor branca	Hifas septadas. Conidióforo verticilado e conídios.	<i>Verticillium</i>
16	0,5	circular	Convexa	Filiforme	Finamente granulosa/cotonosa	Filamentoso de cor verde-escuro no centro passando a branco no rebordo	Hifas septadas. Conidióforo verticilado com formação de fiálides e presença de conídios.	<i>Penicillium</i>
17	1,5	Filamentosa	Crateriforme	Filiforme	Cotonosa	Filamentoso de cor branca com verde escuro acinzentado no centro	Hifas septadas. Conidióforo não septado e dilatado no topo (vesícula) com formação de fiálides e presença de conídios. Presença de ascósporos e ascos.	<i>Aspergillus</i>
18	3,6	Filamentosa	Achatada	Filiforme	Algodonosa	Rasteiro cor amarelo claro no centro passando a branco nos rebordos	Conídios de forma ovoide e septados.	<i>Alternaria</i>
19	1,6	Circular e filamentosa	Convexa	Filiforme	Algodonosa	Aéreo filamentoso de cor branco creme	Hifas septadas. Macro e microconídios. Presença de clamidósporos.	<i>Fusarium</i>
20	1,0	Circular e rizoide	Achatada	Filiforme	Arenosa	Rasteiro de cor castanho claro	Hifas septadas. Conidióforo não septado e dilatado no topo (vesícula) com formação de fiálides e presença de conídios.	<i>Aspergillus</i>
21	2,9	Irregular	Crateriforme	Ondulada e filiforme	Cotonosa. Com protuberância	Rasteiro de cor branco com azul esverdeado muito claro	Hifas septadas. Conidióforo verticilado com formação de fiálides e presença de conídios.	<i>Penicillium</i>

22	3,0	Circular/Filamentosa	Achatada	Filiforme	Arenosa	Rasteiro de cor castanho chocolate no centro e branco claro nos rebordos	Hifas septadas. Conidióforo não septado e dilatado no topo (vesícula) com formação de fíalides e presença de conídios.	<i>Aspergillus</i>
----	-----	----------------------	----------	-----------	---------	--	--	--------------------

4.3.2 Identificação de leveduras

Foram identificadas apenas duas espécies de leveduras, *Rhodotorula mucilaginosa* (Figura 16 A) e *Cryptococcus laurentii* (Figura 16 B). A caracterização morfológica destas leveduras encontra-se na Tabela 6. Na Tabela 7 observa-se a abundância relativa destas duas espécies identificadas.

Foram encontradas um total de $9,25 \times 10^3$ UFC/g_{solo} de leveduras, número relativamente baixo quando comparado com o número de bactérias e fungos filamentosos. Esta situação está de acordo com o descrito por Phaff *et al.* (1978), citado em El-Tarabily e Sivasithamparam (2006). Na literatura é descrito que a população de leveduras é também afetada pela profundidade do solo. Concentram-se preferencialmente nas camadas 2 a 10 cm de profundidade (Phaff *et al.*, 1978; citado em El-Tarabily e Sivasithamparam, 2006), podendo variar entre 10 a 10^6 de células por grama de solo (Do Carmo-Sousa, 1969; Phaff e Starmer, 1987, citados em Botha, 2011).

É também referido na literatura que as maiores populações de leveduras ocorrem na rizosfera (Badr El-Din *et al.*, 1986; Cloete *et al.*, 2009 citados em Botha, 2011). No solo a sua presença é também dependente de um conjunto de fatores como o tipo de solo, pH, composição química e condições climáticas (Do Carmo Sousa, 1969; Alexander 1977, citados em El-Tarabily e Sivasithamparam, 2006). Contudo, Falih e Wainwright (1995) e Vishniac (1995), citados em Fracchia *et al.* (2003), referem que pouco se sabe sobre a ecologia das leveduras e o papel que desempenham no ciclo mineral. Também, salientam que a sua interação com outros microrganismos do solo é pouco conhecida.

Rhodotorula mucilaginosa foi encontrada apenas na parcela superior. Esteve presente num total de $2,0 \times 10^3$ ufc/g_{solo}, isto é, numa percentagem de 22%. Segundo a literatura, as espécies do género *Rhodotorula* são leveduras basidiomicetas que produzem geralmente pigmentos carotenoides (Libkind *et al.*, 2004, Akhtyamova e Sattarova, 2013). Podem surgir como antagonistas de fungos patogénicos (Akhtyamova e Sattarova, 2013) e participar na transformação dos nutrientes no solo, através da solubilização de fosfato e oxidação do azoto (Botha, 2011). Também, podem estimular a colonização dos fungos micorrízicos com as raízes das plantas. Fracchia *et al.* (2003) verificaram que os exsudados produzidos por *Rhodotorula mucilaginosa* induziam um efeito benéfico no crescimento das hifas dos fungos micorrízicos arbusculares *Glomus mosseae* e *Gigaspora rosea*. Assim, a capacidade de *Rhodotorula mucilaginosa* para estimular o crescimento

de hifas micorrízicas pode aumentar as probabilidades de estabelecimento micorrízico com as raízes e a eficácia no crescimento das plantas.

Cryptococcus laurentii apresentou contagens totais de $7,25 \times 10^3$ ufc/g_{solo} correspondendo a uma abundância relativa de 78%. Trata-se de uma levedura basidiomiceta (Rosa e Péter, 2006), e segundo Sláviková e Vadkertiová (2000, 2003) pertence a um grupo de leveduras capsuladas, que sobrevivem bem em habitats pobres nutricionalmente e em condições de baixa humidade. Botha (2011) refere que leveduras representantes do género *Cryptococcus* participam na formação dos agregados do solo e manutenção da sua estrutura pela produção de compostos extracelulares. Estudos também indicam que esta levedura quando presente na rizosfera pode induzir o crescimento das raízes das plantas. Um exemplo é o estudo realizado por Cloete *et al.* (2009) que avaliaram a interação simbiótica de *Cryptococcus laurentii* com uma planta medicinal (*Agathosma betulina*) adaptada a solos com baixos teores de nutrientes, tendo verificado melhoria do desempenho radicular da planta aumentando, conseqüentemente, a sua capacidade de sobrevivência.

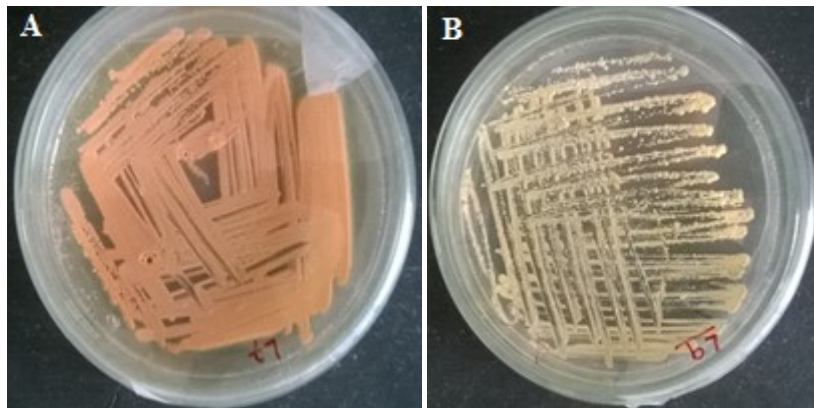


Figura 16 – Aspeto macroscópico das leveduras isoladas: (A) *Rhodotorula mucilaginosa* e (B) *Cryptococcus laurentii*

Tabela 6 - Características morfológicas e respetiva identificação das leveduras isoladas do solo das hortas do IPB.

Leveduras		Características morfológicas					Identificação por Galerias API 20 AUX	
Código	Diâmetro (mm)	Forma	Margem	Elevação	Cor	Transparência	Espécie Identificada	% Identificação
1	3	Circular	Inteira	Convexa	Salmão	Cremosa e brilhante	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	97,8
2	2	Circular	Inteira	Convexa	Amarelo creme	Cremosa e brilhante	<i>Cryptococcus laurentii</i>	81,3

Tabela 7 - Abundância de leveduras identificadas no solo das hortas do IPB

Espécies de leveduras	UFC/g _{solo}				Total	Abundância (%)
	Parcela superior		Parcela inferior			
	0-10 cm	0-20 cm	0-10 cm	10-20 cm		
<i>Cryptococcus laurentii</i>	2,25x10 ³	1,0x10 ³	4,0 x10 ³	0,0	7,25x10 ³	78
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1,0 x10 ³	1,0x10 ³	0,0	0,0	2,00x10 ³	22
Total	3,25x10 ³	2,0x10 ³	4,00x10 ³	0,0	9,25x10 ³	100

4.4 Avaliação da produção de antibióticos por actinomicetas

4.4.1 Efeito dos metabolitos produzidos por Actinomicetas em bactérias

Na Tabela 8 apresentam-se os resultados do efeito dos metabolitos produzidos por Actinomicetas isoladas do solo das hortas do IPB contra bactérias Gram positivo (*Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*) e Gram negativo (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*). Foram testados um total de 20 Actinomicetas isoladas das várias amostras colhidas nas parcelas superior e inferior nas profundidades 0-10 cm e 10-20 cm. Na Figura 17 podemos observar o aspeto visual de um halo de inibição (Figura 17, A e B) e de ausência de inibição (Figura 17, C e D).

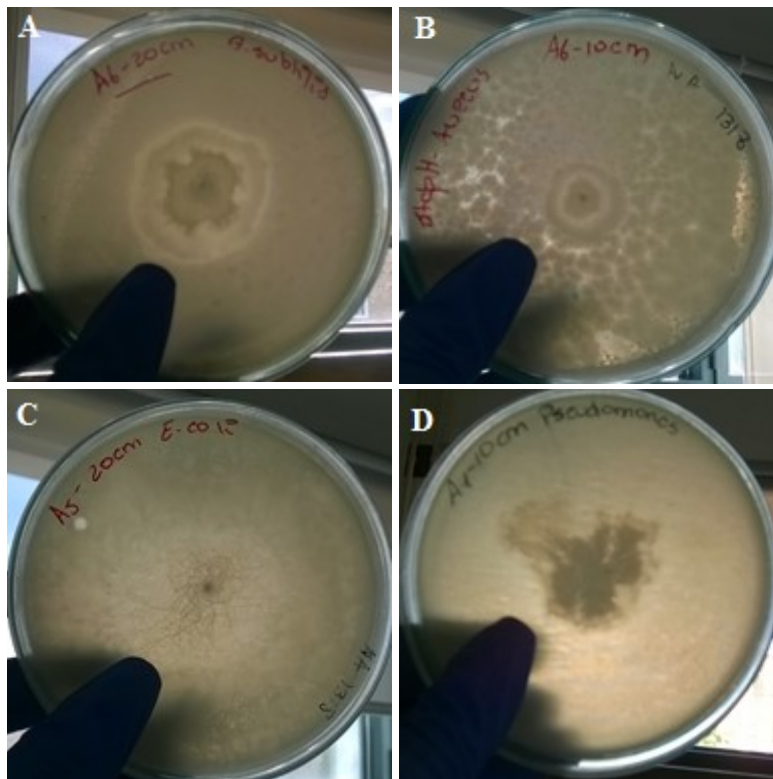


Figura 17 – Aspecto visual da presença de halo de inibição em *Bacillus subtilis* (A) e *Staphylococcus aureus* (B) e ausência de inibição em *Escherichia coli* (C) e *Pseudomonas aeruginosa* (D).

Tabela 8 – Resultado da atividade antimicrobiana dos Actinomicetas contra as bactérias alvo em amostras de terra colhidas nas parcelas superior e inferior nas profundidades 0-10 e 10-20 cm.

Variáveis	Categorias	Inibição				Sig. ⁽¹⁾	Total	
		Presença		Ausência			n	(%)
		n	(%)	n	(%)			
Parcela	Superior	25	31,3	15	18,8	0,591	40	50
	Inferior	25	31,3	15	18,8		40	50
	Total	50	62,6	30	37,6		80	100
Profundidade	0-10 cm	28	35	12	15	0,124	40	50
	10-20 cm	22	27,5	18	22,5		40	50
	Total	50	62,5	30	37,5		80	100
Bactérias Alvo (Total)	<i>Bacillus subtilis</i>	20	25	0,0	0,0	0,000	20	25
	<i>Staphylococcus aureus</i>	14	17,5	6	7,5		20	25
	<i>Escherichia coli</i>	8	10,0	12	15,0		20	25
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	10,0	12	15,0		20	25
	Total	50	62,5	30	37,5		80	100
Bactérias Alvo (Inibição a 10 cm)	<i>Bacillus subtilis</i>	10	25	0,0	0,0	2,4*	10	25
	<i>Staphylococcus aureus</i>	8	20	2	5	0,8*	10	25
	<i>Escherichia coli</i>	5	12,5	5	12,5	-1,6*	10	25
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	12,5	5	12,5	-1,6*	10	25
	Total	28	70	12	30		40	100
Bactérias Alvo (Inibição a 20 cm)	<i>Bacillus subtilis</i>	10	25	0,0	0,0	3,3*	10	25
	<i>Staphylococcus Aureus</i>	6	15	4	10	0,4*	10	25
	<i>Escherichia coli</i>	3	7,5	7	17,5	-1,8*	10	25
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	7,5	7	17,5	-1,8*	10	25
	Total	22	55	18	45		40	100

Sig. - Significância do teste estatístico (Nível de Significância de 5%)

⁽¹⁾ Qui-quadrado de Pearson

*Resíduos Ajustados (RA)>1,96

Da análise dos resultados, verifica-se que não existiram diferenças significativas na capacidade de inibição das bactérias alvo pelos metabolitos produzidos por Actinomicetas quer em relação à parcela ($p = 0,591$), quer em relação à profundidade ($p = 0,124$). Embora não seja significativo, existe uma tendência para uma maior inibição por parte dos metabolitos produzidos por Actinomicetas das amostras colhidas a 10 cm de profundidade.

Verifica-se um efeito significativo na inibição das bactérias teste utilizadas, havendo diferenças entre elas. As bactérias Gram positivas foram mais sensíveis, destacando-se *Bacillus subtilis* ($RA_j = 2,4$ e $3,3 > 1,96$). Heck (2007) também observou o mesmo padrão de inibição, verificando um maior efeito de inibição contra bactérias Gram positivas. Silva *et al.* (2008) também verificaram uma maior percentagem de inibição em bactérias Gram positivas que em bactérias Gram negativas. Os diferentes efeitos de inibição aqui verificados podem estar relacionados com diferenças na constituição da parede celular. Isto poderá ser explicado pelo facto da parede celular bacteriana, especialmente nas bactérias gram-negativo, serem barreiras eficientes que conferem resistência contra moléculas candidatas a fármacos. Estas barreiras apresentam características altamente polares e a presença de bombas de efluxo que atuam como mecanismos de resistência, ejetando para fora os compostos que conseguem atravessar a membrana externa. Os extratos efetivos contra bactérias Gram-negativo apresentam compostos químicos polares capazes de interagir com a composição química da estrutura da parede celular bacteriana, promovendo os seus efeitos.

4.4.2 Intensidade da inibição

Na Tabela 9 são apresentados os resultados do teste não paramétrico à distribuição das áreas dos halos de inibição. No Tabela 10 encontram-se os resultados obtidos do teste de comparação múltipla de médias de modo a identificar quais as bactérias alvo utilizadas foram mais suscetíveis ao efeito inibidor induzido pelos metabolitos produzidos por Actinomicetas, isto é tamanhos de halos significativamente diferentes.

Tabela 9 - Resultados do teste não paramétrico à distribuição das áreas dos halos (mm²).

Bactérias Alvo	$\bar{x} \pm Dp$	Mediana (AIQ)	Sig.
<i>Bacillus subtilis</i>	11,34 ± 5,87	11,04 (6,26 – 15,60)	$p = 0,001^*$
<i>Staphylococcus aureus</i>	7,16 ± 7,06	6,20 (0,00 – 13,0)	
<i>Escherichia coli</i>	4,63 ± 6,78	0,00 (0,00 – 9,62)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3,86 ± 5,53	0,00 (0,00 – 6,52)	

$\bar{x} \pm Dp$: Média ± Desvio Padrão

AIQ: Amplitude interquartil

* Valor de significância do teste de Kruskal-Wallis, com probabilidade de 5 %

Tabela 10 - Comparações entre as bactérias alvo segundo a área do halo (mm²) de inibição.

	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Bacillus subtilis</i>		0,184	0,002*	0,001*
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,184		0,754	0,373
<i>Escherichia coli</i>	0,002*	0,754		1,000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,001*	0,373	1,000	

*Diferença estatisticamente significativa entre as áreas dos halos de acordo com o teste de Bonferroni, com nível de significância 5%

Da análise dos resultados constata-se que o grau de inibição variou com o tipo de bactéria alvo ($p = 0,001$). De acordo com a comparação múltipla de médias das áreas dos halos de inibição (Tabela 10), *Bacillus subtilis* apresentou um grau de inibição significativamente diferente de *Escherichia coli* e de *Pseudomonas aeruginosa*, sendo *Bacillus subtilis* o que evidenciou maior halo de inibição. Este efeito pode ser justificado pelas diferenças na constituição da parede celular, como já foi referido anteriormente. No caso das bactérias Gram negativo, particularmente em *Pseudomonas aeruginosa*, além de apresentarem na parede celular uma estrutura de peptidoglicanos, possui uma membrana externa que restringe a penetração de alguns compostos antimicrobianos pela barreira de permeabilidade que lhe confere (Tegos, 2002; Carvalho e Alterthum, 2004; Nobre, 2008; citados em Bomfim, 2010).

Adicionalmente, a presença de halos significativamente diferentes pode também dever-se à possibilidade das espécies de Actinomicetas isolados serem diferentes. De facto, foram testados 20 actinomicetas isoladas do solo, as quais não foram identificadas. Gopinath *et al.* (2013) verificou que oito isolados de actinomicetas pertencentes a diferentes espécies induziram graus de inibição distintos na mesma bactéria teste. Os resultados obtidos por Gopinath *et al.* (2013) foram também corroborados pelas observações de Oskay *et al.* (2004) que avaliaram a atividade antimicrobiana de 17 actinomicetas pertencentes a espécies diferentes.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

5. Conclusões e Perspetivas Futuras

De um modo geral, este trabalho demonstrou que na microbiota do solo das hortas comunitárias do IPB predominam as bactérias aeróbias mesófilas. Esta situação parece estar relacionada com o pH próximo da neutralidade. Os valores de abundância bacteriana foram inferiores aos apontados na literatura, o que poderá estar associado às condições climáticas na altura em que foi efetuada a recolha das amostras. A população fúngica encontrou-se dentro dos valores médios para um solo fértil. Este facto parece estar relacionado com os teores elevados de fósforo existente no solo, de acordo com o descrito por Lopes (2014).

O solo das hortas da parcela inferior tende a ter mais microrganismos, como resultado de um maior possível teor de matéria orgânica em relação ao existente no solo das hortas da parcela superior.

A população de bactérias aeróbias mesófilas diminuiu com a profundidade. Este efeito verificou-se especialmente no solo das hortas da parcela superior. A população de fungos existente nas amostras de solo à profundidade 0-10 cm não diferiu muito da observada a 10-20 cm.

Não se verificou uma correlação estatisticamente significativa entre o pH do solo e a distribuição de bactérias aeróbias mesófilas e fungos.

Dos 22 fungos filamentosos isolados, foram identificados os géneros *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Pythium*, *Verticillium* e *Rizophus*, destacando-se o *Penicillium* com o maior número de isolados.

Encontrou-se um número relativamente reduzido de leveduras, sendo a *Rhodotorula mucilaginosa* e *Cryptococcus laurentii* como as únicas espécies presentes.

Os metabolitos produzidos por actinomicetas isolados de ambas as parcelas das hortas tendem a ter a mesma capacidade de inibição, quer a 10 cm ou a 20 cm de profundidade. As áreas dos halos de inibição foram significativamente diferentes com o tipo de bactéria alvo. *Bacillus subtilis* foi o que evidenciou maior suscetibilidade. O menor efeito de inibição observou-se contra as bactérias Gram negativas.

O conhecimento da microbiota do solo fornece-nos uma indicação sobre o estado do solo. Em Portugal, pouca atenção é dada a estes parâmetros. Os microrganismos são importantes promotores do crescimento das plantas pelo contributo que têm na fertilidade do solo e estrutura do solo. De fato, as práticas agrícolas (como adubações, utilização de

pesticidas e inseticidas) induzem um efeito significativo nas comunidades microbianas. Deste modo, seria importante realizar mais investigações no ramo da microbiologia do solo e incentivar produtores para práticas agrícolas mais sustentáveis, monitorizando e conservando a biodiversidade.

Este é o primeiro estudo referente à caracterização microbiológica de solos hortícolas. O seu conhecimento poderá ser útil para a utilização racional do solo. Convém no entanto salientar, que os resultados obtidos neste trabalho são preliminares.

No futuro, será importante avaliar as variações quantitativas da população microbiana de acordo com as diferentes escalas sazonais; realizar estudos de produtividade de culturas associados à biomassa microbiana; identificar quais as espécies bacterianas presentes e sua abundância relativa; identificar os fungos filamentosos recorrendo à técnica de Biologia Molecular e determinar a sua abundância existente; identificar quais as espécies de actinomicetas presentes são produtoras de antibióticos e estudar também o seu efeito contra bactérias e fungos fitopatogénicos de interesse agronómico.

Referências Bibliográficas

Abelho, M. (2013). Protocolos de Microbiologia Ambiental: Parte 1 – Métodos básicos em microbiologia. Escola Superior Agraria do Instituto Politécnico de Coimbra.

Afonso, A. C. S. (2011) Estudo da microbiologia dos solos em pedreiras revegetadas: caso de estudo da pedreira da Secil, no Outão. Doutoramento em Biologia (Microbiologia). Universidade de Lisboa - Faculdade de Ciências.

Afonso, N.; Arrobas, M. (2009). Contribuição para a Elaboração da Carta de Solos da Cidade de Bragança. Qualidade do Ambiente Urbano: Novos Desafios, p.136 – 142.

Akhtyamova, N.; Sattarova, R. K. (2013). Endophytic Yeast *Rhodotorula rubra* Strain TG-1: Antagonistic and Plant Protection Activities. *Biochemistry & Physiology*, Volume 2, Issue 1.

Alabouvette, C. C. (1999). *Fusarium* wilt suppressive soils: an example of disease-suppressive soils. *Australasian Plant Pathology*, 28, 57-64

Altieri, M. A. (1999). The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 74, 19-31.

Anderson, T.H., 2003. Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 98, 285-293.

Aouar, L. (2012). Isolement et identification des actinomycètes antagonistes des microorganismes phytopathogènes. Thèse présentée à Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Mentouri-Constantine pour l'obtention du Diplôme de Doctorat en Sciences En Biochimie et Microbiologie Appliquées.

Arrobas, M.; Pereira, E. (2010). Manual de Boas Praticas em Espaços Verdes, Câmara municipal de Bragança, p. 23-28.

Azuma, M. V. P. (2011). Actinobactérias com potencial biotecnológico isoladas da Região Entre-Marés da Ilha do Mel, PR, Brasil. Dissertação apresentada à Universidade Federal do Paraná para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Baker, P. (1997). The distribution and diversity of Actinomycetes in soil fraction. Thesis submitted for the Degree of Doctor of Philosophy, Department of Biological Sciences, University of Warwick.

Barrios, E. (2007). Soil biota, ecosystem services and land productivity. *Ecological Economics*, 64, 269 – 285.

Biederbeck, V. O., Campbell, C. A. (1973). Soil microbial activity as influenced by temperature trends and fluctuations. *Can., J., Soil Sci.*, 53: 363-376.

Bomfim, G. F. (2010). Atividade antimicrobiana de microrganismos isolados de cupinzeiros da região da Mata de Cipó, Bahia. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Borges, L. R.; Lazzari, S. M. N.; Pimentel, I, C.; Nova, M. X. V. (2011). Diversidade de fungos filamentosos em solo de monocultivo de erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil. *Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient., Curitiba*, v. 9, n. 2, p. 185-194

Borowik, A.; Wyszowska, J. (2016). Soil moisture as a factor affecting the microbiological and biochemical activity of soil. *Plant Soil Environ.*, Vol. 62, No. 6: 250–255.

Borrero, C.; Trillas, M. I.; Ordovás, J.; Tello, J. C.; Avilés, M. (2004). Predictive Factors for the Suppression of Fusarium Wilt of Tomato in Plant Growth Media. *Phytopathology*, Vol. 94, No. 10, 1094-1101.

Bot, A.; Benites, J. (2005). The importance of soil organic matter - Key to drought-resistant soil and sustained food and production. *FAO Soils Bulletin*, 80. ISSN 0253 – 2005.

Botha, A. (2011). The importance and ecology of yeasts in soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 43, 1-8.

Brandão, E. M. (1992). Os componentes da comunidade microbiana do solo. In: *Microbiologia do Solo*. CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M. & NEVES, M C P. eds. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, 1-15.

Breure, A., M. (2004). Soil Biodiversity: measurements, indicators, threats and soil functions. I International Conference Soil and Compost Eco-Biology, León – Spain.

Bridge, P.; Spooner, B. (2001). Soil fungi: diversity and detection. *Plant and Soil* 232: 147–154.

Bueno, C. J. (2006). Manejo de fungos fitopatogênicos habitante do solo. *Pesquisa & Tecnologia*, vol. 3, n.2

Buscot, F.; Varma, A. (2005). *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions*. Soil Biology, Springer.

Casal, M.; Schuller, D.; Ribeiro, A.; Cardoso, H.; Nobre, A. (2004). Unidade X - Prospecção de bactérias produtoras de antibióticos. Disponível em: <https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/2763/1/Livro%20Actinomicetas%200.pdf>.

Cloete, K. J; Valentine, A. J.; Stander, M. A; Blomerus, L. M; Botha, A. (2009). Evidence of Symbiosis Between the Soil Yeast *Cryptococcus laurentii* and a Sclerophyllous Medicinal Shrub, *Agathosma betulina* (Berg.) Pillans. *Microb Ecol*, 57: 624–632.

Coleman, D. C. (2013). Soil Biota, Soil Systems, and Processes. In: Levin S.A. (ed.) *Encyclopedia of Biodiversity*, second edition, Volume 6, pp. 580-589. Waltham, MA: Academic Press.

Correâ, G. G. (2014). Potencial Biotecnológico de Actinobactérias da Rizosfera de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. Do Bioma Caatinga. Dissertação apresentada ao Curso de

Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Djigal, D. (2003). Interactions entre la communauté microbienne du sol (bactéries et champignons mycorrhiziens) et les nématodes bactéricivores: effet sur la nutrition minérale et la croissance de différentes plantes. These pour l'obtention du diplôme de docteur de 3ème cycle de biologie végétale présentée à la Faculté des Sciences et Techniques de la Université Cheikh Anta Diop De Dakar.

El-Tarabily, K. A.; Sivasithamparam, K. (2006). Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Mycoscience*, 47, p. 25–35.

Encyclopædia Britannica (2008). Disponível em <https://www.britannica.com/science/Chytridiomycota>

Ethur, L. Z.; Blume, E.; Muniz, M. F. B; Antonioli, Z. I.; Nicolini, C.; Milanesi, P.; Fortes, F. O. (2008). Presença dos gêneros *Trichoderma* e *Fusarium* em solo rizosférico e não rizosférico cultivado com tomateiro e pepineiro, em horta e estufa. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.38, n.1, p.19-26.

FAO, 2016. Disponível em <http://www.fao.org/soils-portal/soil-biodiversity/en/>.

Faugier, A. (2010). Diversité bactérienne des sols : accès aux populations à effectifs minoritaires "the rare biosphere". Thèse présentée devant L'École Centrale De Lyon pour l'obtention du grade de Docteur, Spécialité en Microbiologie.

Fernandes, S. C. D. (2009). Comunidades bacterianas em solos com capacidade de retenção de radionuclídeos. Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia.

Finlay, R. D. (2004). Mycorrhizal fungi and their multifunctional roles. *Mycologist*, Volume 18, Part 2

Fracchia, S.; A. Godeasa, A.; Scervino, J. M.; Sampedro, I.; Ocampob, J. A.; García-Romera, I. (2003). Interaction between the soil yeast *Rhodotorula mucilaginosa* and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Gigaspora rosea*. *Soil Biology & Biochemistry*, 35, 701–707.

Fravel, D.; Olivain, C.; Alabouvette, C. (2002). *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist*, 157, 493–502.

Goberna, M., Pascual, J.A., García, C., Sánchez, J., (2007). Do plant clumps constitute microbial hotspots in semiarid Mediterranean patchy landscapes? *Soil Biology and Biochemistry* 39, 1047-1054.

Goberna, M.; Insam, H.; Klammer, S.; Pascual, J. A.; Sánchez, J. (2005). Microbial community structure at different depths in disturbed and undisturbed semiarid Mediterranean forest soil. *Microbial Ecology*, v.50, 3, p.315-326.

Goi, S. R.; Souza, F. A. (2006). Diversidade de microrganismos do solo. *Floresta e Ambiente*, V.13, n.2, p. 46 – 65.

Gopinath, B. V.; Vootla, P. K.; Jyothi, R.; Reddy, K. S. (2013). Antimicrobial Activity of Actinomycetes Isolated From Coal Mine Soils of Godavari Belt Region, A.P, India. *Asian J. Exp. Biol. Sci.*, Vol. 4 (4), p. 518-523.

Grantina, L.; Seile, E.; Kenigvalde, K.; Kasparinskis, R.; Tabors, G.; Nikolajeva, V.; Jungerius, P.; Muiznieks, I. (2011). The influence of the land use on abundance and diversity of soil fungi: comparison of conventional and molecular methods of analysis. *Environmental and Experimental Biology*, 9, 9–21.

Gray, T. R. G.; Williams, S. T. (1971). *Soil Micro-organisms*. Longman Group Limited. London.

Hamdan, L. (2010). Caractérisation de la communauté fongique impliquée dans la minéralisation de soufre organique dans les rhizosphères de colza et d'orge. Thèse présentée pour l'obtention du titre de Docteur de l'INPL en Sciences Agronomiques.

Heck, M. G. (2007). Produção de compostos antimicrobianos provenientes do metabolismo de *Streptomyces* sp. Linhagem 2S. Dissertação apresentada à Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Hoorman, J. J. (2011). The role of soil fungus. Fact Sheet: Agricultural and Natural Resources, SAG-14-11, p. 1-6.

ISO 4833:2003-Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of microorganisms -Colony-count technique at 30 degrees C.

Kurtzman, C. P.; Fell, J. W.; Boekhout, T.; Robert, V. (2011). Methods for Isolation, Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeasts. Chapter 7, p.87-110.

Lacasse, D. (1995). Introdução à Microbiologia Alimentar.

Landsman, W. J., Dighton, J. (2010). Response of soil microbial communities and the production of plant-available nitrogen to a two-year rainfall manipulation in the New Jersey Pinelands. *Soil Biology and Biochemistry*, 42 (10), 1751-1758.

Lauber, C. L.; Strickland, M. S.; Bradford, M. A., Fierer, N. (2008). The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biology & Biochemistry*, 40, 2407–2415.

Lavelle, P.; Spain, A.V. (2001). *Soil Ecology*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.

Leite, L. F. C.; Araújo, A. S. F. (2007). *Ecologia Microbiana do Solo*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Meio-Norte. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Documentos 164.

Libkind, D.; Brizzio, S.; Van Broock, M. (2004). *Rhodotorula mucilaginosa*, a Carotenoid Producing Yeast Strain from a Patagonian High-Altitude Lake. *Folia Microbiol.*, 49 (1), 19–25.

Lins, M. R. C. R. (2014). Seleção de Actinobactérias da Rizosfera da Caatinga com potencial para promoção de crescimento vegetal. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Lopes, H. G. A. (2014). Avaliação do estado nutricional e do teor em metais pesados de plantas cultivadas nas hortas sociais do Instituto Politécnico de Bragança. Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Agroecologia.

Martinez, A. T.; Ramirez, C. (1978). Microfungal biomass and number of propagules in an andosol. *Soil Biology and Biochemistry*, v.10, n.6, p. 529-531.

Mateus, A. (Coord.) (2008). Solo: a pele da Terra. Departamento de Geologia da FCUL, Lisboa, 45 pp. Disponível em <http://geologia.fc.ul.pt/documents/163.pdf>

Melo, F. M. (2009). Bioprospecção de Actinobactérias da rizosfera de milho (*Zea mays* L.) com atividade antifúngica. 105 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo.

Mesquita, V. A. (2014). Caracterização da diversidade microbiológica de solo do Cerrado de Minas Gerais por eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE). Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Genética de Microrganismos.

Moreira, F. M. S.; Siqueira, J. O. (2006). *Microbiologia e Bioquímica do solo*, 2a Edição, Editora UFLA.

Moreira, H. M. G. (2006). Caracterização físico-química de águas e solos da ilha de Porto Santo. Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Molecular.

Moreira, H.; Santos, C.; Mendo, S. (2007). Estudos microbiológicos preliminares de amostras de solo da Ilha de Porto Santo. Boletim do Museu Municipal do Funchal, Sup. N.º 12: 43-52.

Nannipieri, P.; Ascher, J.; Ceccherini, M. T.; Landi, L.; Pietramellara, G. ; Renella, G. (2003). Microbial diversity and soil functions. European Journal of Soil Science, 54, 655-670.

Nimmo, J. R. (2013). Porosity and Pore Size Distribution. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences, Elsevier.

NP-2077 (1985). Carnes, derivados e produtos cárneos. Contagem de bolores e leveduras. Método de referência. Lisboa: IPQ

Osaki, F. (2008). Distribuição espacial de microrganismos e fertilidade em solos de dois ecossistemas florestais: floresta ombrófila mista e povoamento florestal com *Pinus taeda* L. em Tijucas do Sul-PR. Dissertação apresentada à Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Florestais.

Oskay, M.; Tamer, A. Ü.; Azeri, C. (2004). Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. African Journal of Biotechnology Vol. 3 (9), pp. 441-446

Paul, E. A. (2007). Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry. Third Edition.

Paul, E. A. (2015). Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry. Fourth Edition.

Paul, E. A.; Clark, F., E. (1989). Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press, Inc.

Paul, E. A.; Clark, F., E. (1996). Soil Microbiology and Biochemistry. 2ª Edição. Academic Press, Inc

Pfüller et al. (2016). População microbiana sob sistemas de plantio direto e convencional e dois sistemas de rotações de culturas. RAMVI, Getúlio Vargas, v.3, n.5, ISSN 2358-2243.

Pradhan, N.; Sukla, LB. (2005). Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. African Journal of Biotechnology Vol. 5 (10), pp. 850-854.

Pryor, B. M.; Davis, R. M.; Gilbertson, R. L. (1998). Detection of Soil borne *Alternaria* radicina and its Occurrence in California Carrot Fields. The American Phytopathological Society, Publication n. D-1998-0615-06R, p. 891-895.

Rahman, A.; Islam, M. Z.; Islam, A. Ul. (2011). Antibacterial Activities of Actinomycete Isolates Collected from Soils of Rajshahi, Bangladesh. Biotechnology Research International, Article ID 857925, 6 pages.

Raimundo, J. R. L. (2003). Remediação de solos contaminados com fases líquidas não aquosas (NAPL's) através de oxidação química in situ. Dissertação de mestrado integrado em Engenharia Química apresentada à Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.

Rech, M.; Pansera, M. R.; Sartori, V. e C. ti; Ribeiro, R. T. S. (2013). Microbiota do solo em vinhedos agroecológico e convencional e sob vegetação nativa em Caxias do Sul, RS. Revista Brasileira de Agroecologia, 8(3): 141-151.

Rillig, M. C.; Mummey, D. L. (2006). Mycorrhizas and soil structure. New Phytologist, 171, 41–53.

Rodrigues, H. J. B.; Abreu Sá, L. D.; Ruivo, M. L. P.; Costa, A. C. L.; Silva, R. B.; Moura, Q. L.; Mello, I. F. (2011). Variabilidade quantitativa de população microbiana associada às condições microclimáticas observadas em solo de floresta tropical úmida. Revista Brasileira de Meteorologia, v.26, n.4, 629 – 638.

Rodrigues, M. Â.; Peixinho, D.; Nobre, S.; Oliveira, P.; Arrobas, M. (2013). Boas práticas agroecológicas em horticultura urbana. Innovar y producir para el futuro - VII Congreso Ibérico de Agroingeniería y Ciencias Hortícolas.

Rosa, C. A.; Péter, G. (2006). *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Springer.

Rosselló-Mora, R.; Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 25, 1, 39-67.

Schuller, D. (2004). Unidade IV - Interações microrganismo-planta: bactérias do género *Rhizobium* e a fixação de azoto. Disponível em: <https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/2235/1/U4.pdf>

Schüßler, A., Schwarzott, D. and Walker, C. (2001) 'A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution', *Mycological Research*, 105(12), pp. 1413–1421.

Silva, M. G.; Oliveira, M. F.; Van Der Sand, S. T. (2008). Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Actinomicetos Endofíticos de Tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). IX Salão de Iniciação Científica – PUCRS.

Silva, M. S. (2012). Identificação de actinobactérias em solos de cerrado mineiro durante a estação de baixa pluviosidade. Dissertação de Mestrado em Microbiologia, Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola. Universidade Federal de Lavras.

Six, J.; Bossuyt, H.; Degryze, S.; Denef, K. (2004). A history of research on the link between (micro)aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. *Soil and Tillage Research*, 79, 7–31.

Sláviková, E.; Vadkertiová, R. (2000). The occurrence of yeasts in the forest soils. *J. Basic Microbiol.* 40 (3), 207–212

Sláviková, E.; Vadkertiová, R. (2003). The diversity of yeasts in the agricultural soil. *J. Basic Microbiol.*, 43 (5), 430–436.

Sousa, C. S; Menezes, R. S. C.; Sampaio, E. V. B.; Lima, F. S. (2012). Glomalina: características, produção, limitações e contribuição nos solos. *Ciências Agrárias, Londrina*, v. 33, suplemento 1, p. 3033-3044.

Souza, C. N. (2010). Diversidade de fungos do solo da Mata Atlântica. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Souza, F. A.; Silva, I. C. L.; Berbara, R. L. L. (2007). Fngos micorrízicos arbusculares muito mais diversos do que se imaginav. Biodiversidade, Capítulo 15, p. 501-556.

Thies, J. E.; Grossmann, J. M. (2006). Biological Approaches to Sustainable Soil Systems. Taylor and Francis Group, p. 59-78.

Torsvik, V.; Øvreås, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5:240–245.

Turbé, A.; Toni, A.; Benito, P.; Lavelle, P.; Lavelle, P.; Ruiz, N.; Van der Putten, W. H.; Labouze, E.; Mudgal, S. (2010). Soil biodiversity: functions, threats and tools for policy makers. Bio Intelligence Service, IRD, and NIOO, Report for European Commission (DG Environment).

Wakelin, S. A.; Warren, R. A.; Harvey, P. R.; Ryder, M. H. (2004). Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. *Biol. Fertil. Soils*, 40: 36–43.

Wallenius, K. (2011). Microbiological characterisation of soils: Evaluation of some critical steps in data collection and experimental design. Academic Dissertation presented the Faculty of Agriculture and Forestry of the University of Helsinki (Finland).

Zinger, L. (2009). Variations spatio-temporelles de la microflore des sols alpins. Thèse pour l'obtention du titre de Docteur en Biologie, Mention Biodiversité-Ecologie-Environnement, présentée à l'Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant de la Université Joseph Fourier – Grenoble.

Anexos

Anexo I- Composição dos meios de cultura utilizados


Bactérias aeróbias mesófilas	
Designação	<i>Plate Count Agar</i> (PCA)
Composição	Triptona – 5 g ; Glucose – 1g; Extracto de levedura – 2.5g; Agar – 15 g pH final (25°C) = 7,0 ± 0,2
Fungos e Leveduras	
Designação	<i>Potato Dextrose Agar</i> (PDA)
Composição	Infusão de batata – 200g; Dextrose – 20g; Agar – 15g pH final (25°C) = 5,6 ± 0,2
Actinomicetas	
Designação	<i>Mueller Hinton Agar</i>
Composição	Infusão de carne bovina – 300g; Caseína hidrolisada – 17,5g; Amido – 1,5g; Agar – 15g pH final (25°C) = 7,3 ± 0,2
Designação	Meio Nutriente Agar (NA)
Composição	Extracto de carne – 3g; Peptona – 5g; Agar – 15g
Designação	Meio Nutriente Agar semi-sólido (NA-semi-sólido)
Composição	Extracto de carne – 3g; Peptona – 5g; Agar – 8g

Anexo II – Composição do azul de Algodao de Lactofenol

Azul de Algodão de Lactofenol

Composição	Fenol Cristalizado – 20 g
	Ácido láctico – 20 ml
	Glicerina – 40 ml
	Água destilada – 20 ml
	Azul de Algodão – 0,05 g

Anexo III – Composição do meio API C Medium

Ampola de API C Medium 	Sulfato de amónio	5 g
	Fosfato monopotássico	0,31 g
	Fosfato dipotássico	0,45 g
	Fosfato dissódico	0,92 g
	Cloreto de sódio	0,1 g
	Cloreto de cálcio	0,05 g
	Sulfato de magnésio	0,2 g
	L-Histidina	0,005 g
	L-Triptofano	0,02 g
	L-Metionina	0,02 g
	Agente gelificante	0,5 g
	Solução de vitaminas	1 ml
	Solução de oligoelementos	10 ml
Água	q.b. 1000 ml	
pH final : 6,4 - 6,8 (a 20° - 25°C)		