

Capítulo 6

Amostragem de solo para análises biológicas

Raquel Ghini, Sueli dos Santos Freitas e

Anibal Ramadan Oliveira

Atividades agrícolas provocam significativos impactos na biota do solo. Por esse motivo, os organismos habitantes do solo constituem importantes indicadores de alterações ambientais. Existe um grande número de variáveis biológicas que podem ser quantificadas em amostras de solo para estudos de qualidade ambiental em áreas agrícolas. Entre as mais utilizadas estão a densidade, a frequência, a atividade e a biomassa de organismos. Essas variáveis representam importantes aspectos ecológicos, como a distribuição de populações e a diversidade de espécies, informando sobre processos biológicos e interação de organismos nas áreas investigadas. Neste capítulo, pelas características peculiares de seu estudo, os organismos do solo serão didaticamente divididos em microrganismos, compreendendo algas, bactérias e fungos do solo, e macrorganismos, ou componentes da fauna do solo, compreendendo protozoários, nematóides, enquitreídeos, minhocas, ácaros e colêmbolos do solo.

Análises biológicas podem ser baseadas tanto em pequenas quantidades de solo mantidas em laboratório com algum fim específico quanto em áreas estabelecidas no campo. Embora no primeiro caso todo o solo possa ser analisado em experimentos laboratoriais, a coleta e a contagem de todos os indivíduos de uma população ou comunidade presentes em uma determinada área no campo é praticamente impossível. Assim, apenas uma pequena parte dos indivíduos, ou uma amostra, pode ser avaliada quanto às variáveis de interesse, permitindo inferências sobre os resultados para a população ou comunidade como um todo. Mesmo no caso de experimentos laboratoriais, o

solo levado ao laboratório provavelmente deve representar uma área no campo, em cuja amostragem geralmente ocorrem falhas. Embora os problemas relacionados às etapas de coleta, transporte e armazenamento de amostras sejam freqüentemente ignorados, tais atividades influenciam diretamente os resultados. Conseqüentemente, o planejamento da amostragem deve ser cuidadoso, uma vez que a precisão das estimativas obtidas depende do grau de erro dos procedimentos analíticos e do quão representativas são as amostras.

Quando a distribuição espacial dos organismos visados na área é ao acaso, os erros de amostragem podem ser mantidos dentro de limites razoáveis. Porém, quando a distribuição não é ao acaso, uma acurada amostragem torna-se mais difícil e os resultados podem ser inválidos. A distribuição de organismos no solo é influenciada por muitos fatores, como alimento, água, profundidade, raízes e interação com outros organismos, e assim raramente apresenta-se ao acaso. Inúmeras vezes recorre-se à análise química de variáveis ligadas direta ou indiretamente à presença ou à atividade de organismos, como, por exemplo, o carbono e o nitrogênio da biomassa microbiana, a atividade respiratória do solo e a disponibilização de alguns nutrientes. Nesses casos, os cuidados com a tomada de amostras tornam-se bastante semelhantes aos recomendados para as análises de fertilidade do solo. Entretanto, tais procedimentos não são adequados em outros tipos de análises e alguém que se propusesse a definir métodos específicos para a amostragem de todos os organismos em cada uma das situações possíveis teria diante de si uma tarefa extremamente difícil. No entanto, em muitos dos casos, as amostragens de solo para análises biológicas em áreas agrícolas apresentam aspectos comuns, os quais serão abordados neste capítulo juntamente com os problemas referentes a cada procedimento adotado.

6.1. Representatividade da amostra

O primeiro ponto que se pode questionar é a representatividade da amostra em relação à área. Quanto a esse aspecto, do ponto de vista prático, a amostragem para fins de análises biológicas guarda semelhanças com a que é feita para análise da fertilidade do solo, como por exemplo, de nitrogênio, assunto abordado em outro capítulo deste livro.

Amostragem de solo para análises biológicas

Deve-se lembrar que quanto mais homogênea for a área que se deseja representar com uma amostra, mais representativa será essa amostra. Assim, uma primeira recomendação será dividir a área total de interesse em subáreas semelhantes quanto ao maior número possível de características definíveis. Para tanto, a obtenção de informações detalhadas a respeito da área de coleta é indispensável. Os seguintes fatores bióticos e abióticos, segundo Paul & Clark (1989), são de grande importância para a divisão da área em estudos com microrganismos, podendo também contribuir para a interpretação dos resultados: topografia, tamanho e tipo de partículas, tipo e material de origem do solo, conteúdo de nutrientes, histórico de manejo, histórico da vegetação, cobertura vegetal e produtividade, presença de raízes, adição de matéria orgânica, presença de animais, teor de CO₂ e O₂, teor de umidade, variação de temperatura, quantidade e distribuição de chuvas.

Microrganismos possuem algumas peculiaridades que tornam a amostragem um pouco diferente e exigem alguns procedimentos diferenciados das análises de fertilidade. Pela extrema sensibilidade microbiana às variações ambientais, como a temperatura, a umidade, a concentração de oxigênio e o valor de pH, a presença de certos grupos de microrganismos pode variar bastante no espaço de alguns centímetros de solo. Por exemplo: Blackwood & Paul (2003) observaram que diferentes frações do solo – classificadas de acordo com sua densidade – abrigavam diferentes comunidades bacterianas, provavelmente devido à maior ou menor disponibilidade de carbono orgânico para a atividade microbiana. Num caso extremo, Ellingsoe & Johnsen (2002) citam o trabalho de Parkin (1987), que observou que, dentro de uma amostra de 98 g de solo, toda a desnitrificação microbiana ocorria numa subamostra de apenas 0,08 g.

Também os macrorganismos apresentam grande sensibilidade a fatores bióticos e abióticos de variação local, como a disponibilidade de alimento, umidade, temperatura, porosidade do solo, sombreamento e sistema radicular, entre outros. Como a distribuição desses fatores raramente é homogênea, a maioria dos macrorganismos freqüentemente apresenta distribuição espacial vertical ou horizontal agregada, com grande variação na composição específica e no número de indivíduos no espaço de apenas alguns centímetros de solo

(WALLWORK, 1976; BACHELIER, 1978; EDWARDS, 1991). A irregularidade na distribuição vertical de protozoários e nematóides, por exemplo, determinada mais pela presença de alimento do que de água, é um fator de grande importância a ser considerado na amostragem, sendo a maioria de indivíduos geralmente encontrada em camadas de solo com maior quantidade de raízes e matéria orgânica (AESCHT & FOISSNER, 1996). Tanto a distribuição vertical quanto a horizontal agregadas caracterizam as populações de artrópodes no solo, tendo, além da presença de alimento, também a disponibilidade de água como uma de suas principais causas (USHER et al., 1982, citando o trabalho de Usher, 1976). Segundo Winter & Voroney (1993), os fatores mais importantes que determinam a abundância de microartrópodos no solo, representados principalmente por ácaros e colêmbolos, são: 1) o tipo e a quantidade de resíduos orgânicos em decomposição e seus efeitos na microbiota, 2) a estabilidade estrutural do solo e resultante porosidade e 3) a umidade. Como esses fatores variam localmente, grande quantidade de indivíduos pode estar presente em certas regiões do solo, associada a fragmentos vegetais em decomposição, por exemplo, enquanto pequenas quantidades ocorrem a apenas alguns centímetros de distância. Padrões de distribuição espacial de diversos componentes da fauna do solo e os fatores que os afetam podem ser encontrados nos trabalhos de Phillipson (1971), Berthet & Gerard (1965) e Usher (1975).

A irregularidade na distribuição de organismos ressalta a importância da homogeneidade tanto da área quanto da amostra de solo na análise de micro e macrorganismos. Nesse sentido, medidas que visem atenuar o efeito da heterogeneidade de microambientes produzida por fatores locais também devem ser consideradas. Conforme a espécie vegetal cultivada, tanto a distribuição do sistema radicular como o grau de sombreamento do solo, entre outros fatores, podem variar com a posição da amostra em relação à base das plantas. Para padronização, a posição da amostra em relação às plantas nas linhas e entrelinhas pode ser um fator importante a considerar na determinação dos pontos de amostragem, como foi adotado por Oliveira et al. (2000). Tomadas as medidas de padronização, a decisão quanto ao número de subamostras cabe inteiramente ao pesquisador, que levará em conta o

Amostragem de solo para análises biológicas

máximo de informações que tiver sobre a área e sobre o método que utilizará para determinação daquela variável. O importante é que a amostra em que se fará a análise seja homogênea.

Muitos autores utilizam amostras compostas na coleta de microrganismos (KLEIN & PASCHKE, 2000), isto é, resultantes da mistura de algumas subamostras, com a finalidade de aumentar a homogeneidade e reduzir custos, pela análise de um menor número de amostras, porém mais representativas. O número de subamostras varia muito, indo de duas (SALINAS-GARCÍA et al., 2002), ou cinco (GONZÁLEZ et al., 2003) até dez (PANKHURST et al., 2002). Entretanto, essa abordagem é válida sob determinadas condições: as amostras devem ser compostas por igual número e quantidade de subamostras e não deve haver interação entre as subamostras individuais que possa afetar os resultados (WOLLUM II, 1994).

Amostras compostas também podem ser utilizadas para alguns grupos de macrorganismos, como protozoários e nematóides (McSORLEY & WALTER, 1991; AESCHT & FOISSNER, 1996). Embora ferramentas estatísticas que permitam determinar o número de subamostras necessárias sejam escassas, a maioria dos pesquisadores utiliza entre 10 e 20 subamostras (AESCHT & FOISSNER, 1996). Amostras compostas, entretanto, geralmente não são indicadas para a maioria dos outros grupos faunísticos do solo. O procedimento altera a estrutura do solo e prejudica a remoção posterior dos indivíduos, principalmente por métodos dinâmicos tradicionais de extração como funis de Berlese-Tullgren, Macfadyen e Kempson (EDWARDS & FLETCHER, 1971; ADIS, 1987, 2002; EDWARDS, 1991; OLIVEIRA et al., 2000), além de poder destruir organismos delicados pelo efeito abrasivo das partículas do solo ao se misturarem as subamostras individuais.

Variações sazonais, juntamente com o desenvolvimento da própria cultura vegetal, também exercem grande influência na biomassa e atividade microbiana, assim como na fauna do solo. Isso é resultante da combinação de fatores como temperatura, umidade e vegetação, além da modificação dos efeitos de práticas agrícolas ao longo do tempo, como a reestruturação do solo, sombreamento e adição de matéria orgânica ao solo, entre outros. Uma forma de se obter uma mais completa caracterização da biota do solo é a

realização de repetidas amostragens durante o ano, procedimento de grande importância para o reconhecimento de variações sazonais. Embora a exigência quanto à frequência de coleta varie conforme os organismos de interesse, no caso da fauna – considerando-se que há limitações em relação ao número de amostras possível de ser processado por coleta ou ao longo do estudo – é recomendável que as amostragens representem o maior número possível de fases da área investigada. Para uma única avaliação, a coleta de amostras não deve ser imediatamente após um evento climático extremo, como um longo período de seca, por exemplo.

Todavia, como medida de padronização, Oliveira et al. (2000) realizaram coletas dois dias após o término de precipitações pluviais superiores a 20 mm em diferentes períodos, permitindo que a umidade nas amostras de solo estivesse sempre em torno de 25% nas diferentes épocas de amostragem. Outros fatores, como a adição de fertilizantes minerais ou compostos orgânicos, também podem alterar a atividade microbiana, assim como a fauna do solo.

O pesquisador deparar-se-á, inevitavelmente, com a necessidade da decisão sobre o número de amostras do solo a serem coletadas, assim como de repetições. A obtenção de amostras representativas, com análises cujos resultados possam ser tratados estatisticamente, é extremamente importante. Na definição quanto ao número de pontos a serem amostrados, o pesquisador deverá valer-se do conhecimento da área e do processo que deseja medir, considerando a distribuição espacial específica dos organismos de interesse na análise. Geralmente, uma avaliação preliminar auxilia a definição dos procedimentos de amostragem e evita problemas futuros (VEERESH & RAJAGOPAL, 1988). Nesse sentido, técnicas de geoestatística podem complementar a estatística clássica para auxiliar a coleta de dados de campo, nos casos em que as observações não são espacialmente independentes.

Baath & Anderson (2003), por exemplo, utilizaram cinco amostras para representar uma área de 2500 m², na avaliação da taxa respiratória de fungos e de bactérias, separadamente. Já Chapman et al. (2003) – com outro objetivo, embora tenham também avaliado a respiração, entre outras variáveis – dividiram a área com três linhas paralelas de 180 m de comprimento e distantes 50 m entre si. Cada linha foi dividida em dez partes, com onze

Amostragem de solo para análises biológicas

pontos sobre cada uma. Tomaram amostras em todos os pontos de interseção dessa malha. Nesse último trabalho, os autores compararam uma série de variáveis químicas e microbiológicas como indicadores de mudanças no manejo do solo. Os números de amostras em um e outro trabalho estão ligados diretamente aos objetivos dos autores. Segundo Wollum II (1994), o número depende de quão precisa se deseja a determinação. Não se pode esquecer que um número excessivo de amostras demanda mais tempo e mais trabalho, fatores que devem ser ponderados na definição da quantidade de amostras tomadas. Ainda de acordo com Wollum II (1994), “coletar informações demais gasta tempo e recursos; informações de menos tornam o estudo inútil ou levam a conclusões erradas.”

No caso da fauna, a decisão quanto ao número de amostras talvez seja a etapa mais crítica no planejamento da amostragem. Devido ao alto grau de agregação apresentado pela maioria dos macrorganismos, freqüentemente do tipo binomial negativa, o número de pontos de coleta geralmente exigido para uma amostragem representativa é bastante alto. Obviamente, a definição sobre o número de amostras necessário, assim como sobre outros aspectos a serem considerados na amostragem, deve ser rigorosamente baseada em um estudo prévio da área, além de informações disponíveis da literatura sobre os grupos faunísticos de interesse. Nesse sentido, Phillipson (1971), Eijsackers & Bund (1980) e Schinner et al. (1996) oferecem informação sobre características das agregações de diferentes grupos faunísticos, freqüência de coleta e número de pontos de amostragem geralmente adotado para cada grupo por período de coleta (10 amostras no mínimo para protozoários, nematóides e enquitreídeos). O número adotado para microartrópodos, principalmente ácaros e colêmbolos, é muito variável. Entretanto, independentemente do número de pontos amostrados, a maioria dos estudos geralmente enfrenta dificuldade na obtenção de amostras representativas. No caso de ácaros oribatídeos, por exemplo, uma vez que o número de indivíduos coletados em cada ponto apresenta normalmente grande variação, um número muito grande de amostras é geralmente necessário para estimativa da média de indivíduos em uma determinada área, apesar de gerar dificuldades no processamento das amostras. Como recomendação geral para análises

faunísticas em solos cultivados, onde a abundância de indivíduos é geralmente baixa, devem ser tomadas amostras do maior número possível de pontos do solo, levando também em conta aspectos práticos como custos, mão de obra, capacidade de processamento de amostras e características do método de extração a ser utilizado.

6.2. Coleta das amostras de solo

Antes de proceder à amostragem, alguns autores mencionam especificamente a necessidade da retirada da camada de serapilheira, composta por material orgânico ainda não decomposto e, portanto, possível indutora de grandes variações na atividade microbiana (BAATH & ANDERSON, 2003; CHAPMAN et al., 2003; VOR et al., 2002). Apesar da enorme diversidade e abundância de microartrópodos e outros macrorganismos que podem habitar a serapilheira, apenas a coleta de amostras de solo será abordada no presente capítulo com relação ao estudo da fauna.

Tanto a quantidade do solo a ser amostrado quanto a profundidade de amostragem são muito variáveis, dependendo dos organismos de interesse e da finalidade da análise. A profundidade de coleta em áreas agrícolas limita-se geralmente à camada agricultável do solo (0 a 20 ou 25 cm) ou ao horizonte que concentra maior quantidade de raízes (0-10 cm) (PHILLIPSON, 1971; FORSTER, 1995; SCHINNER et al., 1996).

Na amostragem de solo para utilização em análises químicas da presença e da atividade de microrganismos, poucos pesquisadores mencionam problemas de contaminação, uma vez que esse não seria um fator crítico. É de se supor que, desde que o instrumento não esteja “sujo” com a amostra anterior, pequenas partículas eventualmente presentes não representariam fonte relevante de contaminação de uma substância química a ser analisada em uma amostra com 50 ou 100 gramas de solo. Mas Blume et al. (2002) tomaram cuidados para evitar a contaminação do solo da subsuperfície com o da superfície, uma vez que estavam comparando a biomassa microbiana, a estrutura da comunidade e a atividade metabólica nas camadas de 0-20, 70-90 e 150-170 cm de profundidade, em amostras não perturbadas.

Amostragem de solo para análises biológicas

O instrumento utilizado para a amostragem do solo foi primeiramente lavado com água e depois com etanol, como forma de evitar a contaminação. Com o mesmo objetivo, descartaram 1 cm do solo em toda a volta dos núcleos das amostras utilizando uma espátula esterilizada. Assim, como recomendação geral, os implementos e recipientes devem estar desinfestados e cuidados devem ser tomados para evitar a contaminação entre as amostras.

Há uma grande variação entre a quantidade de solo a ser amostrada para as diferentes finalidades em análises microbiológicas. Alguns trabalhos utilizam pequenos agregados de solo para estudos de supressividade a fitopatógenos (GHINI & NAKAMURA, 2001), outros necessitam de amostras com 5 a 10 g, como por exemplo, para determinação de atividade microbiana por hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA, BOEHM & HOITINK, 1992). Há também os que necessitam amostras maiores, perturbadas ou não, coletadas com trados grandes. Preferencialmente, entretanto, amostras similares quanto ao tamanho devem ser obtidas para permitir uma acurada avaliação entre as amostras.

Para análises microbiológicas, os autores são praticamente unânimes em relatar que o solo deve ser submetido a peneiramento, com a finalidade de eliminar pedras, raízes e material orgânico não decomposto. Na grande maioria dos experimentos o solo é passado por peneira com malha de 2 mm (MENDHAM et al., 2003; MENYAILO et al., 2003; BAILEY et al., 2002; PANKHURST et al., 2002; BARROTI & NAHAS, 2000; JOERGENSEN, 2000; KLEIN & PASCHKE, 2000; BARAJAS-ACEVES et al., 1999; CHABOT et al., 1996). Mas há autores que optam por peneiras de malhas diferentes, como as de 4 mm (BALOTA et al., 2003; GHANI et al., 2003; LU et al., 2002), 5 mm (CHAPMAN et al., 2003; KOURTEV et al., 2002; NGUYEN & HENRY, 2002) e até mesmo 0,149 mm (CRITTER et al., 2001). Nesse caso da malha mais estreita tratava-se de um trabalho em que o solo fora submetido a estudos de microcalorimetria na avaliação da atividade microbiana; pelo pequeno volume de cada amostra empregada o tamanho das partículas de solo era fundamental.

O peneiramento é realizado para obterem-se resultados mais reproduzíveis, reduzindo os efeitos da heterogeneidade natural dos solos. Esse

procedimento é justificável para trabalhos que não estão avaliando a distribuição natural de microrganismos no solo. Também deve ser considerado que o peneiramento, de certa forma, seleciona microrganismos que não estão associados a partículas maiores ou agregados que serão excluídos. Essa operação também pode alterar a composição original da microbiota, já que a fragmentação da matéria orgânica torna-a mais disponível ao ataque dos microrganismos e, assim, estimula a atividade microbiana. Um período de pré-incubação, com a finalidade de neutralizar os efeitos do peneiramento, é recomendado.

Existem várias fontes de informação detalhada disponíveis sobre metodologia de coleta de amostras de solo para análises faunísticas. As amostras normalmente são coletadas com o auxílio de ferramentas de amostragem específicas, denominadas sondas. Embora as sondas sejam geralmente cilíndricas, feitas de aço ou alumínio, são muitos os modelos e materiais que podem ser utilizados. Simples anéis metálicos com uma das extremidades cortante podem ser empregados na coleta de amostras de até 5 cm de profundidade. Para profundidades maiores do que 5 cm, são normalmente utilizados tubos metálicos divididos longitudinalmente em duas partes iguais, que permitem abertura da sonda para remoção do solo. As sondas, ao serem inseridas no solo, permitem a coleta de amostras com dimensões definidas. O diâmetro das amostras e a profundidade de coleta dependem das características das espécies de interesse no estudo, como tamanho dos indivíduos, abundância e grau de agregação, de modo que o tamanho das porções de solo amostradas pode variar de 2,5 cm a 1 m de diâmetro e de 5 a 50 cm de altura. Para protozoários e nematóides usualmente são utilizadas sondas de cerca de 2,5 cm de diâmetro, variando entre 3 e 5 cm. A profundidade de coleta em áreas agrícolas geralmente varia entre 5 e 15 cm da superfície do solo. Para enquitreídeos, ácaros e colêmbolos, sondas de cerca de 5 cm geralmente são suficientes, podendo variar entre 5 e 8 cm (PHILLIPSON, 1971; EDWARDS, 1991; SCHINNER et al., 1996). A mais alta concentração de indivíduos normalmente é encontrada próxima à superfície do solo e, portanto, normalmente é suficiente uma amostragem a uma profundidade de 15 cm. Nesse caso, a amostra deve ser separada em camadas de no máximo

Amostragem de solo para análises biológicas

5 cm antes da extração dos indivíduos, principalmente se forem adotados métodos dinâmicos tradicionais de extração como funis de Berlese-Tullgren, Macfadyen e Kempson.

Para minhocas e artrópodos grandes, devem ser utilizadas sondas entre 10 e 30 cm, coletando-se a uma profundidade entre 10 a 20 cm da superfície do solo (ADIS, 1987, 2002; EDWARDS, 1991; SCHINNER et al., 1996). Como recomendação geral para a coleta de amostras de solo para avaliação de microartrópodos, é de extrema importância que o solo não seja compactado durante a coleta, procurando-se manter as características naturais de porosidade das amostras da maneira mais integral possível.

6.3. Transporte e armazenamento

Uma vez retiradas, as amostras para análise de microrganismos devem ser acondicionadas em sacos plásticos, que têm a vantagem de serem permeáveis a gases como O₂ e CO₂ mas não permitirem a desidratação das amostras neles contidas (WOLLUM II, 1994). A desidratação do solo pode reduzir o número e alterar a composição da comunidade microbiana. O transporte das amostras deve ser imediato, logo após a coleta do solo. No caso de amostras não perturbadas, deve-se evitar vibração ou agitação do material.

Para análise dos macrorganismos, também é importante que as amostras sejam acondicionadas em temperatura e recipientes adequados antes do transporte ao laboratório. O acondicionamento deve ser feito de maneira a se promover o menor distúrbio possível nas características estruturais naturais do solo, evitando-se compactação. Amostras mais superficiais, isto é, retiradas de até 5 cm de profundidade, coletadas com sondas anelares, não necessitam ser removidas do interior dos anéis coletores, sendo cada unidade amostral transportada ao laboratório dentro de uma sonda. Apesar da necessidade de um grande número de anéis, uma vantagem desse tipo de sonda é que, como a manipulação da porção de solo amostrada não é necessária, afeta-se em menor grau a porosidade natural, aspecto importante na extração dos macrorganismos por métodos dinâmicos como funis de Berlese-Tullgren, Macfadyen e Kempson.

No caso dessas sondas, com amostras parcialmente protegidas pelas paredes dos anéis, pode-se simplesmente acondicionar cada conjunto sonda-amostra em um saco plástico ou embalá-lo com filme de PVC. No caso de coletas em maiores profundidades, as amostras devem ser removidas do interior da sonda – tubo metálico dividido longitudinalmente – e repartidas em camadas de no máximo 5 cm de altura, principalmente no caso da utilização subsequente de métodos dinâmicos de extração. Deve-se tomar muito cuidado no momento de manipular o solo para divisão das camadas, de modo a não pressionar ou compactar as amostras. Nesse caso, o acondicionamento de cada camada em pequenas caixas plásticas com tampas é mais indicado do que o uso de sacos plásticos, para evitar compactação. Uma vez embaladas, as amostras devem ser acomodadas em caixas de poliestireno para proteção contra o calor e a insolação. Deve-se evitar qualquer tipo de sobreposição de amostras no interior das caixas que possa causar pressão sobre o solo. As amostras devem ser levadas ao laboratório o mais breve possível, protegidas contra vibração durante o transporte.

Com relação ao armazenamento de amostras para análises faunísticas, o ideal é que o processamento das amostras para extração dos macrorganismos se inicie assim que cheguem ao laboratório ou, no máximo, 24 horas após a coleta (EDWARDS & FLETCHER, 1971; MEYER, 1996), principalmente se forem adotados métodos dinâmicos, os mais comumente utilizados para a extração dos indivíduos (EDWARDS, 1991). Se necessário, durante o tempo anterior ao processamento, as amostras devem ser mantidas em temperatura ambiente, ou a 25°C. Alguns autores sugerem o armazenamento de amostras sob refrigeração (EDWARDS, 1991; WINTER & VORONEY, 1993), mas como seu efeito na extração dos indivíduos, principalmente dos artrópodos, por métodos dinâmicos ainda não está bem esclarecido (EDWARDS & FLETCHER, 1971; LAKLY & CROSSLEY, 2000), é melhor que o resfriamento seja evitado.

Quanto aos microrganismos, a questão do armazenamento também é um ponto importante a ser considerado. Como raramente se pode processar todas as amostras ao mesmo tempo, em que condições devem ser mantidas em laboratório até que as análises sejam feitas? A recomendação

Amostragem de solo para análises biológicas

geral é que as amostras sejam mantidas nas mesmas condições físicas, químicas e biológicas que elas se encontravam *in situ*, a partir do momento da coleta até a realização da análise, o que é impossível. Do ponto de vista prático, é quase unânime o armazenamento sob refrigeração. A maioria dos autores recomenda que as amostras sejam coletadas e colocadas em caixas contendo gelo e, após o transporte até o laboratório, sejam mantidas em geladeira (4 °C). Outros acreditam que é preferível manter em temperatura ambiente, com a finalidade de reduzir os efeitos das alterações de temperatura nas amostras. Outra possibilidade interessante é preservar as amostras em recipientes térmicos ou similares. Willians & Gray (1973) sugerem que blocos maiores de solo podem ser obtidos em campo, levados ao laboratório e subamostras retiradas imediatamente antes da análise. A viabilidade desse procedimento depende principalmente das características físicas do solo e da disponibilidade de coleta, transporte e armazenamento de todo esse material. O ideal, em todos os casos, é que as amostras sejam utilizadas logo após a coleta.

Quando há armazenamento em geladeira, o período em que podem ser mantidas a essa temperatura sem que os resultados sejam comprometidos ainda não está bem definido. Na literatura encontram-se procedimentos bastante diversificados: Blume et al. (2002) iniciaram suas análises após a coleta das amostras, que ficaram no máximo 48 horas no refrigerador, enquanto que Raubuch & Beese (1999) mantiveram as amostras a 4 °C por até quatro meses e Baath & Anderson (2003), por cinco meses.

Nem sempre, todavia, o laboratório tem condições de processar todas as amostras ao mesmo tempo, ou num tempo suficientemente curto para que as eventuais mudanças determinadas pelo armazenamento não cheguem a se manifestar nos resultados. Como somente podiam processar poucas amostras por dia, Kourtev et al. (2002) contornaram esse problema sorteando as que iriam avaliar diariamente. Embora não seja um procedimento tão comum, é uma forma de poder desenvolver alguns estudos. Nesse caso, a colaboração de um especialista em estatística será de grande importância.

À parte o questionamento sobre *quanto* o armazenamento altera a microbiota do solo, é certo que deve alterá-la, em maior ou menor extensão. Além disso, quando se considera a variabilidade das comunidades microbianas

no espaço e no tempo, dependendo dos variados microhabitats existentes no solo (BLACKWOOD & PAUL, 2003; ELLINGSOE & JOHNSEN, 2002), o armazenamento pode produzir, inclusive, resultados diferentes em amostras do mesmo solo. Por esse motivo, é freqüente a pré-incubação do solo antes de se iniciarem as análises. A pré-incubação consiste na manutenção das amostras, depois de retiradas da refrigeração, em um ambiente com condições adequadas de umidade e temperatura para que os microrganismos voltem a crescer e tenham seu desenvolvimento estabilizado, após um determinado período. As temperaturas e o tempo pelo qual as amostras são incubadas variam: Chapman et al. (2003) pré-incubaram as amostras a 21 °C por uma semana, enquanto que Bailey et al. (2002) deixaram-nas a 25 °C por duas semanas, Vischetti et al. (2002), a 20 °C por três dias e Turner et al. (2001), a 10-15 °C por uma semana. Como se vê, o importante é permitir que a microbiota possa crescer por algum tempo, até atingir o equilíbrio permitido pelas condições fornecidas. As diferentes análises determinarão os melhores procedimentos a seguir a partir desse momento.

6.4. Amostragem para isolamento ou quantificação de microrganismos rizosféricos

De acordo com Hiltner (1904), rizosfera é o solo sob influência das raízes. É nessa região que ocorre a maior parte da atividade microbiana do solo, pela grande disponibilidade de nutrientes oriundos da exsudação das raízes. É também aí que se registram as interações de plantas e microrganismos, sejam elas benéficas ou deletérias. Portanto, a rizosfera constitui-se em boa fonte de isolados microbianos para quem deseja trabalhar com interações benéficas.

Wollum II (1994) recomenda que se cave o solo em torno do sistema radicular, de modo a permitir que o maior número possível de raízes seja retirado. O sistema radicular é agitado levemente, até soltar o material mais frouxamente preso a ele. O solo aderido às raízes é o que será chamado rizosférico. O conjunto raízes + solo deve ser colocado em sacos plásticos e mantido em caixa com gelo até o transporte para o laboratório. Quando o

Amostragem de solo para análises biológicas

principal objetivo do pesquisador é a obtenção de um isolado potencialmente benéfico, as amostras assim obtidas já poderão ser utilizadas, uma vez que, a rigor, não será quantificada nenhuma atividade. O solo ou os pedaços de raízes devem ser transferidos para um frasco com água ou com uma solução isotônica e os procedimentos de isolamento transcorreriam a partir daí.

Nos casos em que o objetivo é fazer alguma análise comparativa entre solo rizosférico e não rizosférico, pode-se juntar solo e raízes numa única amostra e submeter o conjunto todo a peneiramento. Considerar-se-á solo não rizosférico o que passar por uma peneira. A utilização da peneira é indicada para amostras de solo retiradas no campo, principalmente em presença de gramíneas, com sistema radicular fasciculado. Uma peneira com malha de 2 mm, por exemplo, deverá separar as raízes do volume de solo coletado juntamente. As raízes que ficarem terão solo a elas aderido, que será considerado rizosférico; serão então lavadas e a suspensão, centrifugada. Dessa maneira, separam-se o solo rizosférico e o não rizosférico (JOERGENSEN, 2000).

Todavia, se a intenção for a enumeração de indivíduos de uma espécie ou de um grupo de espécies, ou, ainda, a avaliação de algumas variáveis em um solo caracteristicamente rizosférico também há alguns procedimentos a seguir. O próprio conceito de rizosfera pode ser ponderado: em vasos onde a planta passa semanas ou meses crescendo na mesma porção de solo, as raízes emaranham-se, enovelam-se, de modo a tornar rizosférico praticamente todo o solo. Mesmo trabalhando em condições de campo, Kourtev et al. (2002) definiram como rizosférico o solo nos primeiros 5 cm de profundidade, região com maior concentração de raízes de uma floresta de clima temperado. Para isso, basearam-se na observação de que a grande maioria das raízes estava, no máximo, a 2 mm umas das outras. O solo abaixo do emaranhado de raízes foi considerado não rizosférico. No entanto, em condições de campo, aceita-se normalmente que a rizosfera compreende apenas alguns milímetros em torno das raízes (CARDOSO & FREITAS, 1992). De maneira geral, considera-se solo rizosférico aquele que está aderido às raízes (JOERGENSEN, 2000; REID et al., 1984; WOLLUM II, 1994).

Wollum II (1994) recomenda ainda que não se armazene solo aderido às raízes, mesmo em refrigeração, possivelmente considerando o fato

de que, pela presença de alguma exsudação radicular, ainda que diminuída, possa alterar-se radicalmente a composição da microbiota rizosférica. A recomendação tem razão de ser: Shishido & Chanway (1998) pesquisaram justamente o efeito do armazenamento sobre as comunidades microbianas do solo e sobre a eficácia de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs). Os tratamentos considerados, em três solos diferentes, foram o solo fresco, como testemunha, e solo armazenado por 32 semanas a 4 ou a -10 °C, todos peneirados com malha de 2 mm. O interessante é que mesmo as amostras do tratamento testemunha foram mantidas a 4°C por duas semanas, período entre a amostragem e o início das análises. Observaram que o armazenamento alterou as características das comunidades das amostras, que eram bem semelhantes para os três solos estudados. Essas alterações influenciaram a eficácia das RPCPs estudadas.

Dependendo do objetivo do trabalho e até mesmo dos métodos empregados, deve-se estar atento inclusive ao tamanho da amostra. Com o advento dos métodos independentes de cultivo, os pesquisadores puderam conhecer não apenas os microrganismos que crescem em meios de cultura mas passaram a determinar um número muito grande de genomas diferentes em pequenas amostras de solo, confirmando o fato de que apenas uma pequena porcentagem dos microrganismos é detectada pelos métodos clássicos. Ranjard et al. (2001), citados por Kent & Triplett (2002), utilizando métodos independentes de cultivo, observaram que as espécies microbianas variaram com o tamanho das partículas de solo. À conclusão semelhante chegaram Ellingsoe & Johnsen (2002), num trabalho em que compararam o efeito do volume de amostras de solo sobre a estrutura da comunidade bacteriana aí presente. Avaliaram tanto a estrutura heterotrófica – medida por métodos clássicos de cultivo – quanto a estrutura genética, medida por eletroforese em gradiente de gel denaturante (DGGE). Observaram que a diversidade entre amostras foi maior nas amostras de 0,01 e 0,1 g e quase negligível nas de 1 e 10g, pelos dois métodos de avaliação. Aventaram a hipótese de que, pelo pequeno tamanho, as amostras menores têm um número limitado de habitats, o que não aconteceria com as amostras maiores. Os autores concluíram que amostras maiores devem ser utilizadas quando se deseja medir, por exemplo,

Amostragem de solo para análises biológicas

o efeito de atividades antrópicas sobre a microbiota do solo; no entanto, amostras menores são mais úteis quando se deseja obter isolados novos. No primeiro caso, a ocorrência de maior número de habitats favorece a detecção de alterações oriundas da atividade antrópicas, enquanto que, para isolamento de microrganismos, não necessariamente a variabilidade de habitats seja importante.

Referências

ADIS, J. Extraction of arthropods from neotropical soils with a modified Kempson apparatus. **Journal of Tropical Ecology**, n.3, p.131-138, 1987.

ADIS, J. Recommended sampling techniques. In: ADIS, J. (Ed.). **Amazonian Arachnida and Myriapoda**. Sofia: Pensoft, 2002. 590p.

AESCHT, E.; FOISSNER, W. Microfauna. In: SCHINNER, F.; ÖHLINGER, R.; KANDELER, E.; MARGESIN, R. (Ed.). **Methods in soil biology**. Berlin: Springer-Verlag, 1996. 426p.

BAATH, E.; ANDERSON, T. H. Comparison of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques. **Soil Biology & Biochemistry**, v.35, p.955-963, 2003.

BACHELIER, G. **La faune des sols: son écologie et son action**. Paris: O.R.S.T.O.M., 1978. 391p.

BAILEY, V. L.; SMITH, J. L.; BOLTON Jr., H. Fungal-to-bacterial ratios in soils investigated for enhanced C sequestration. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 34, p. 997-1007, 2002.

BALOTA, E. L.; COLOZZI FILHO, A.; ANDRADE, D. S. & DICK, R. P. Microbial biomass in soils under different tillage and crop rotation systems. **Biology and Fertility of Soils**, v.38, p.15-20, 2003.

BARAJAS-ACEVES, M.; GRACE, C.; ANSORENA, J.; DENDOOVEN, L.; BROOKES, P. C. Soil microbial biomass and organic C in a gradient of zinc concentrations in soils around a mine spoil tip. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 31, p.867-876, 1999.

BARROTI, G.; NAHAS, E. População microbiana total e solubilizadora de fosfato em solo submetido a diferentes sistemas de cultivo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.10, p.2043-2050, 2000.

BERTHET, P.; GERARD, G. A statistical study of microdistribution of Oribatei (Acari). Part I. The distribution pattern. **Oikos**, v.16, p.214-227, 1965.

BLACKWOOD, C. B.; PAUL, E. A. Eubacterial community structure and population size within the soil light fraction, rhizosphere, and heavy fraction of several agricultural systems. **Soil Biology & Biochemistry**, v.35, p.1245-1255, 2003.

BLUME, E.; BISCHOFF, M; REICHERT, J. M.; MOORMAN, T.; KONOPKA, A.; TURCO, R. F. Surface and subsurface microbial biomass, community structure and metabolic activity as a function of soil depth and season. **Applied Soil Ecology**, v.20, p.171-181, 2002.

BOEHM, M. J.; HOITINK, H. A. J. Sustenance of microbial activity in potting mixes and its impact on severity of Pythium root rot of Poinsettia. **Phytopathology**, v.82, n.3, p.259-264, 1992.

CARDOSO, E. J. B. N.; FREITAS, S. S. A rizosfera. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. (Ed.). **Microbiologia do solo**. 1. ed. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p.41-57.

CHABOT, R.; ANTOUN, H.; CESCAS, M. P. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. **Plant and Soil**, v.184, p.311-321, 1996.

CHAPMAN, S. J.; CAMPBELL, C. D.; PURI, G. Native woodland expansion: soil chemical and microbiological indicators of change. **Soil Biology & Biochemistry**, v.35, p.753-764, 2003.

CRITTER, S. A. M.; FREITAS, S. S.; AIROLDI, C. Calorimetry versus respirometry for the monitoring of microbial activity in a tropical soil. **Applied Soil Ecology**, v.18, p.217-227, 2001.

EDWARDS, C.A. The assessment of populations of soil-inhabiting invertebrates. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.34, n.1-4, p.145-176, 1991.

Amostragem de solo para análises biológicas

EDWARDS, C.A.; FLETCHER, K.E. A comparison of extraction methods for terrestrial arthropods. In: PHILLIPSON, J. (Ed.) **Methods of study in quantitative soil ecology**: population, production and energy flow. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1971. 297p. (IBP Handbook No. 18).

EIJSACKERS, H.; van DE BUND, C.F. Effects on soil fauna. In: HANCE, R.J. (Ed.). **Interactions between herbicides and the soil**. London: Academic Press, 1980. 349p.

ELLINGSOE, P.; JOHNSEN, K. Influence of soil sample sizes on the assessment of bacterial community structure. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 34, p. 1701-1707, 2002.

FORSTER, J.C. Soil sampling, handling, storage and analysis. In: ALEF, K.; NANNIPIERRI, P. (Ed.). **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. 2. ed. London: Academic Press, 1995. p.49-121.

FREITAS, S. S.; MELO, A. M. T.; DONIZELI, V. P. Promoção do crescimento de alface por rizobactérias. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, p. 61-70, 2003.

GHANI, A.; DEXTER, M.; PERROTT, K. W. Hot-water extractable carbon in soils: a sensitive measurement for determining impacts of fertilization, grazing and cultivation. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 35, p. 1231-1243, 2003.

GHINI, R.; NAKAMURA, D. Seleção de antagonistas e nutrientes que induzem supressividade a *Fusarium oxysporum* f. sp. phaseoli em microcosmo e in vitro. **Summa Phytopathologica**, v.27, n.3, p.318-322, 2001.

GONZÁLEZ, M. G.; CONTI, M. E.; PALMA, R. M.; ARRIGO, N. M. Dynamics of humic fractions and microbial activity under no-tillage or reduced tillage, as compared with native pasture (Pampa Argentina). **Biology and Fertility of Soils**, v.39, p.135-138, 2003.

HILTNER, L. Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. **Arb. Deut. Landwirtsch.**, Berlin, v.98, p.59-78, 1904.

JOERGENSEN, R. G. Ergosterol and microbial biomass in the rhizosphere of grassland soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v.32, p.647-652, 2000.

KENT, A. D.; TRIPLETT, E. W. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. **Annual Review of Microbiology**, v.56, p.211-236, 2002.

KLEIN, D. A.; PASCHKE, M. W. A soil microbial community structural-functional index: the microscopy-based total/active/active fungal/bacterial (TA/AFB) biovolumes ratio. **Applied Soil Ecology**, v. 14, p.257-268, 2000.

KOURTEV, P. S.; EHRENFELD, J. G.; HÄGGBLUM, M. Exotic plant species alter the microbial community structure and function in the soil. **Ecology**, v.83, n.11, p. 3152-3166, 2002.

LAKLY, M.B.; CROSSLEY, D.A. Tullgren extraction of soil mites (Acarina): effect of refrigeration time on extraction efficiency. **Experimental and Applied Acarology**, v.24, p.135-140, 2000.

LU, Y.; WATANABE, A.; KIMURA, M. Contribution of plant-derived carbon to soil microbial biomass dynamics in a paddy rice microcosm. **Biology and Fertility of Soils**, v.36, p.136-142, 2002.

McSORLEY, R.; WALTER, D.E. Comparison of soil extraction methods for nematodes and microarthropods. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.34, n.1-4, p.201-207, 1991.

MENDHAM, D. S.; O'CONNELL, A. M.; GROVE, T. S.; RANCE, S. J. Residue management effects on soil carbon and nutrient contents and growth of second rotation eucalypts. **Forest Ecology and Management**, v.181, p.357-372, 2003.

MENYAILO, O. V.; LEHMANN, J.; CRAVO, M. S.; ZECH, W. Soil microbial activities in tree-based cropping systems and natural forests of the Central Amazon, Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, v.38, p.1-9, 2003.

MEYER, E. Introduction. In: SCHINNER, F.; ÖHLINGER, R.; KANDELER, E.; MARGESIN, R. (Ed.). **Methods in soil biology**. Berlin: Springer-Verlag, 1996. 426p.

Amostragem de solo para análises biológicas

NGUYEN, C.; HENRY, F. A carbon-14-glucose assay to compare microbial activity between rhizosphere samples. **Biology and Fertility of Soils**, v.35, p.270-276, 2002.

OLIVEIRA, A.R.; MORAES, G.J. de; DEMÉTRIO, C.G.B.; DE NARDO, E.A.B. **Efeito do vírus de poliedrose nuclear de *Anticarsia gemmatilis* sobre Oribatida edáficos (Arachnida: Acari) em um campo de soja**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 32p. (Embrapa Meio Ambiente. Boletim de Pesquisa, 13).

PANKHURST, C. E.; KIRKBY, C. A.; HAWKE, B. G.; HARCH, B. D. Impact of a change in tillage and crop residue management practice on soil chemical and microbiological properties in a cereal-producing red duplex soil in NSW, Australia. **Biology and Fertility of Soils**, v.35, p.189-196, 2002.

PAUL, E.A.; CLARK, F.E. **Soil microbiology and biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1989. 275p.

PHILLIPSON, J. (Ed.). **Methods of study in quantitative soil ecology: population, production and energy flow**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1971. 297p. (IBP Handbook No. 18).

RAUBUCH, M.; BEESE, F. Comparison of microbial properties measured by O₂ consumption and microcalorimetry as bioindicators in forest soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v.31, p.949-956, 1999.

REID, R. K.; REID, C. P. P.; POWELL, P. E.; SZANISZLO, P. J. Comparison of siderophore concentrations in aqueous extracts of rhizosphere and adjacent bulk soils. **Pedobiologia**, v.26, p.263-266, 1984.

SALINAS-GARCÍA, J. R.; VELÁZQUES-GARCÍA, J. J.; GALLARDO-VALDEZ, M.; DÍAZ-MEDEROS, P.; CABALLERO-HERNÁNDEZ, F.; TAPIA-VARGAS, L. M.; ROSALES-ROBLES, E. Tillage effects on microbial biomass and nutrient distribution in soils under rain-fed corn production in central-western Mexico. **Soil & Tillage Research**, v.66, p.143-152, 2002.

SCHINNER, F.; ÖHLINGER, R.; KANDELER, E.; MARGESIN, R. (Ed.). **Methods in soil biology**. Berlin: Springer-Verlag, 1996. 426p.

SHISHIDO, M.; CHANWAY, C. P. Storage effects on indigenous soil microbial communities and PGPR efficacy. **Soil Biology & Biochemistry**, v.30, p.939-947, 1998.

TURNER, B. L.; BRISTOW, A. W.; HAYGARTH, P. M. Rapid estimation of microbial biomass in grassland soils by ultra-violet absorbance. **Soil Biology & Biochemistry**, v.33, p.913-919, 2001.

USHER, M.B. Some properties of the aggregations of soil arthropods: Cryptostigmata. **Pedobiologia**, v.15, p.355-363, 1975.

USHER, M.B.; BOOTH, R.G.; SPARKES, K.E. A review of progress in understanding the organization of communities of soil arthropods. **Pedobiologia**, v.23, p.126-144, 1982.

VEERESH, G.K.; RAJAGOPAL, D. **Applied soil biology and ecology**. 2. ed. New Delhi: Oxford & IBH, 1988. 375p.

VISCHETTI, C.; CASUCCI, C.; PERUCCI, P. Relationship between changes of soil microbial biomass content and imazamox and benfluralin degradation. **Biology and Fertility of Soils**, v. 35, p. 13-17, 2002.

VOR, T.; DYCKMANS, J.; FLESSA, H.; BEESE, F. Use of microcalorimetry to study microbial activity during the transition from oxic to anoxic conditions. **Biology and Fertility of Soils**, v.36, p.66-71, 2002.

WALLWORK, J.A. **The distribution and diversity of soil fauna**. London: Academic Press, 1976. 355p.

WILLIAMS, S.T.; GRAY, T.R.G. General principles and problems of soil sampling. In: BOARD, R.G.; LOVELOCK, D.W. (Ed.). **Sampling - microbiological monitoring of environments**. London: Academic Press, 1973. pp.111-121.

WINTER, J.P.; VORONEY, R.P. Microarthropods in soil and litter. In: CARTER, M.R. (Ed.). **Soil sampling and methods of analysis**. Boca Raton: Lewis Publishers: Canadian Society of Soil Science, 1993. 823p.

WOLLUM II, A. G. Soil sampling for microbiological analysis. In: WEAVER, R. W.; ANGLE, S.; BOTTOMLEY, P.; BEZDICEK, D.; SMITH, S.; TABATABAI,

Amostragem de solo para análises biológicas

A.; WOLLUM, A. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Part 2. Microbiological and Biochemical Properties. Madison: Soil Science Society of America, 1994. p. 1-14.

