



Microbiología Agrícola

Microbiologia Agrícola

Isabella Alice Gotti

© 2018 por Editora e Distribuidora Educacional S.A.

Todos os direitos reservados. Nenhuma parte desta publicação poderá ser reproduzida ou transmitida de qualquer modo ou por qualquer outro meio, eletrônico ou mecânico, incluindo fotocópia, gravação ou qualquer outro tipo de sistema de armazenamento e transmissão de informação, sem prévia autorização, por escrito, da Editora e Distribuidora Educacional S.A.

Presidente

Rodrigo Galindo

Vice-Presidente Acadêmico de Graduação e de Educação Básica

Mário Ghio Júnior

Conselho Acadêmico

Ana Lucia Jankovic Barduchi

Camila Cardoso Rotella

Danielly Nunes Andrade Noé

Grasiele Aparecida Lourenço

Isabel Cristina Chagas Barbin

Lidiane Cristina Vivaldini Olo

Thatiane Cristina dos Santos de Carvalho Ribeiro

Revisão Técnica

Carolina Belei Saldanha

Paulo Sérgio Siberti da Silva

Editorial

Camila Cardoso Rotella (Diretora)

Lidiane Cristina Vivaldini Olo (Gerente)

Elmir Carvalho da Silva (Coordenador)

Leticia Bento Pieroni (Coordenadora)

Renata Jéssica Galdino (Coordenadora)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Gotti, Isabella Alice

G686m Microbiologia agrícola / Isabella Alice Gotti. – Londrina:

Editora e Distribuidora Educacional S.A., 2018.

208 p.

ISBN 978-85-522-1153-2

1. 1. Microrganismos. 2. Ciclos biológicos. 3. Técnicas microbiológicas. I. Gotti, Isabella Alice. II. Título.

CDD 631

Thamiris Mantovani CRB-8/9491

2018

Editora e Distribuidora Educacional S.A.

Avenida Paris, 675 – Parque Residencial João Piza

CEP: 86041-100 – Londrina – PR

e-mail: editora.educacional@kroton.com.br

Homepage: <http://www.kroton.com.br/>

Sumário

Unidade 1 Introdução à microbiologia agrícola	7
Seção 1.1 - Noções sobre à microbiologia agrícola	9
Seção 1.2 - Efeitos das ações dos microrganismos	23
Seção 1.3 - Aplicações da microbiologia agrícola	36
Unidade 2 Características dos microrganismos de interesse agrícola	53
Seção 2.1 - As bactérias e sua interferência na produção agrícola	55
Seção 2.2 - Os fungos e sua interferência na produção agrícola	72
Seção 2.3 - Os vírus e sua interferência na produção agrícola	90
Unidade 3 Microbiologia e bioquímica do solo	107
Seção 3.1 - Fatores ambientais que afetam os microrganismos	109
Seção 3.2 - Metabolismo e processos microbianos do solo	124
Seção 3.3 - Impacto do manejo agrícola na microbiota do solo	137
Unidade 4 Técnicas em microbiologia agrícola	151
Seção 4.1 - Introdução às técnicas microbiológicas	153
Seção 4.2 - Amostragens para análise microbiológica	169
Seção 4.3 - Isolamento e caracterização de microrganismos	184

Palavras do autor

Olá, aluno! Você já deve ter ouvido falar sobre a microbiologia, não é mesmo? Ela trata do estudo dos microrganismos, suas funções biológicas e também sua aplicação no campo médico, ambiental, industrial e agrícola, sendo um dos pilares da biotecnologia.

Pensando na aplicabilidade à sua prática profissional, iniciamos agora a disciplina de microbiologia voltada justamente para a área agrícola, que será suporte para que você conheça e compreenda a importância da microbiologia neste contexto, bem como sua influência na agricultura.

Este material está dividido em 4 unidades de ensino que levarão você desde o conhecimento mais básico sobre os microrganismos até a aplicação em seu contexto profissional. Assim, ao mergulhar nesse universo microbiológico, você será capaz de identificar e analisar os principais aspectos relacionados aos microrganismos de importância agrícola, além de analisar os impactos do manejo das culturas na microbiota do solo e conhecer as técnicas utilizadas para avaliação e identificação da microbiota de um ambiente agrícola.

A primeira unidade se iniciará justamente com as noções de microbiologia e os principais conceitos. Conheceremos as principais aplicações dos microrganismos na área agrícola bem como os efeitos, tanto positivos quanto negativos que estes podem causar às culturas e ao meio ambiente.

Já na segunda unidade, entraremos um pouco mais no detalhe, conhecendo quais são os tipos de microrganismos de importância para a agricultura e sua interferência na produtividade das lavouras. Conheceremos a morfologia, crescimento, patologia e também benefícios de bactérias, fungos, vírus e protozoários.

Dando continuidade no estudo dos microrganismos (Unidade 3) estudaremos os fatores que interferem em seu desenvolvimento, compreendendo como reduzir a ocorrência de um inóculo patogênico e também como multiplicar ou favorecer aqueles benéficos. Além disso, você conhecerá o metabolismo e os processos bioquímicos realizados pelos microrganismos no solo e ainda como o manejo agrícola pode impactar a microbiota ali existente.

Por fim, a última unidade levará você a uma visão um pouco mais laboratorial, em que conhecerá as técnicas de microbiologia para amostragem, isolamento e identificação de bactérias e fungos, aplicando esses conhecimentos na avaliação de microbiota de uma amostra de solo de determinado local.

Esperamos que você esteja motivado e curioso para conhecer um pouco mais sobre o mundo microscópico que existe junto de nós. Ao final dessa disciplina, você estará mais preparado para entender alguns processos biológicos que ocorrem no campo, podendo aplicar esse conhecimento para a melhoria da produtividade e também a sustentabilidade na agricultura.

Bons estudos!

Introdução à microbiologia agrícola

Convite ao estudo

Olá, aluno! Estamos iniciando a primeira unidade da disciplina de microbiologia agrícola. Os microrganismos são os seres mais antigos do planeta e por meio de seu estudo, e hoje podemos controlar a maior parte de seus efeitos negativos e utilizá-los ao nosso favor, como em processos industriais, no controle de pragas e doenças e na produção de alimentos.

Para que você possa conhecer e compreender a importância da microbiologia no contexto agrícola, nesta unidade estudaremos as noções básicas da microbiologia, entenderemos quais são os efeitos das ações dos microrganismos e aplicaremos esses conteúdos na sua área de atuação.

Nesse sentido, vamos imergir no seguinte cenário profissional: você é um dos engenheiros agrônomos de uma usina do setor sucroenergético. Trata-se de uma usina com reconhecida produção de açúcar de mesa, que abastece o mercado interno e do açúcar tipo exportação. Além disso, a indústria produz etanol hidratado e anidro entre seus produtos. A valorização do etanol como biocombustível alternativo aos combustíveis fósseis e o fortalecimento da exportação do açúcar no mercado externo de *commodities* são fatores que motivaram e induziram a usina em que você trabalha a investir na área de desenvolvimento agrônomo, trazendo uma maior eficiência para a produção canieira. Esta é a área da qual você é gestor e o seu desafio será o levantamento e controle de pragas e doenças da cana-de-açúcar, mantendo a sanidade e produtividade da cultura que será fornecida à indústria.

Você já pensou em como os conhecimentos da microbiologia agrícola poderão lhe ajudar em seu dia a dia

no campo? Quais os efeitos negativos dos microrganismos nas culturas agrícolas? E quais as possíveis aplicações da microbiologia visando benefício da agricultura?

Ao final do estudo dessa unidade você será capaz de responder a essas e outras perguntas, identificando os efeitos positivos e negativos que os microrganismos podem causar às culturas agrícolas. Para tanto, utilizaremos como ponto de partida o contexto descrito acima e o exemplo da cultura da cana-de-açúcar. Pronto para começar?

Seção 1.1

Noções sobre à microbiologia agrícola

Diálogo aberto

Organismos microscópicos como bactérias, fungos e vírus, vivem em nós e junto conosco em quase todos os lugares que frequentamos. Eles possuem uma grande importância, tanto para a nossa saúde quanto para o nosso ambiente, uma vez que podem nos causar doenças, prevenir ou nos curar delas e ainda, ser essenciais na nossa alimentação e no equilíbrio dos ecossistemas.

Assim como no seu corpo, na sua vida profissional os micróbios também serão de grande importância, motivo pelo qual daremos início a esta disciplina. Vamos entender como?

Retomando o contexto apresentado no início desta unidade, suponha que em um dia rotineiro de trabalho, enquanto percorria as áreas de cana com o assistente técnico, você notou, em uma fazenda específica, que algumas folhas apresentavam pontuações amareladas e alongadas, além de manchas de coloração castanho-alaranjadas, de tom não escuro.

Inicialmente, vocês desconfiam que as manchas talvez se tratassem de deficiência nutricional, entretanto, estranham ao arrancar a folha da bainha e perceber que seus dedos ficaram “sujos” com algo que se parecia muito com poeira da estrada, por estar na bordadura da área.

Como bom profissional, você observa que a fazenda está localizada em um terreno plano, de grande altitude e com grande intensidade de ventos. Além disso, nota o solo bem úmido, devido à intensidade de chuvas que foram recorrentes na semana anterior à sua visita. Assim, com assertividade, você explica ao assistente que se trata de ferrugem alaranjada, uma doença ocasionada por fungo.

O assistente técnico que te acompanha não consegue entender como você chegou a essa conclusão tão rápido e realiza alguns questionamentos: caso você não conhecesse essa doença, quais seriam as etapas para provar que esse fungo específico é a causa da doença e confirmar que as lesões estão mesmo sendo ocasionadas

por ele? O que pode ter favorecido esse fungo ter se instalado aqui? E como você explicaria essas perguntas para o assistente?

Para lhe ajudar, nessa seção faremos uma introdução à microbiologia e sua aplicabilidade na agricultura. Além disso, conheceremos o que são os microrganismos, quais são seus ambientes naturais e ainda os fatores ambientais que os afetam.

Não pode faltar

Você já parou para pensar no que é e como surgiu a microbiologia? O termo vem do grego *mikros*, que significa “pequeno”, *bios*, que significa “vida” e ainda *logos*, que significa “ciência”. Interpretando-o, podemos dizer que se trata da ciência que estuda a vida microscópica ou seja, os microrganismos ou micróbios, como ainda podem ser chamados esses seres.

A microbiologia, apesar de simples de ser definida, abrange o estudo da forma, da estrutura, da fisiologia, metabolismo e identificação dos **microrganismos**, além de suas relações com o ambiente em que vivem.



Assimile

De maneira geral, podemos dizer que os **microrganismos** são seres extremamente pequenos para serem vistos ou identificados a olho nu. Incluem nesse grupo os vírus, as bactérias, os protozoários e os fungos, por exemplo.

Lembre-se que esses seres podem ser **procariontes**, como as bactérias, constituídos de uma única célula com núcleo não delimitado por membrana ou **eucariontes**, como os fungos e protozoários, mais complexos e constituídos por células com núcleo delimitado por membrana.

A história da microbiologia é tão antiga que pode ter seu início datado ainda no século I a.C., quando gregos e romanos associaram sinais e sintomas específicos com doenças e perceberam que essas podiam ser transmitidas de uma pessoa para outra (BLACK, 2016).

O avanço da microbiologia foi realmente significativo após o século XVII, quando Hans Jansen desenvolveu lentes feitas a partir de vidro polido, que combinadas podiam proporcionar aumento

suficiente para a visualização dos seres que não eram antes visíveis a olho nu. Surgiu o protótipo simples do que por volta de 1665, por meio do cientista inglês Robert Hooke, se tornaria o microscópio. Com esse microscópio, Hooke observou fatias finas de cortiça, definindo como **célula** o arranjo ordenado de pequenas “caixas” que ele enxergava (BLACK, 2016).

Nessa época, os pesquisadores Robert Hooke e Antony van Leeuwenhoek fizeram as primeiras observações de bactérias e outros microrganismos, relatando suas observações. Segundo Black (2016), Van Leeuwenhoek foi o primeiro a observar organismos vivos, os descrevendo como “animáculos”, motivo pelo qual ainda hoje é considerado e conhecido como o “pai” da microbiologia. Entretanto, de acordo com Vieira e Fernandes (2012), existem relatos realizados por Hooke, descrevendo a estrutura de um fungo que foram publicados anteriormente aos dele, fazendo com que ambos sejam considerados pioneiros nessa ciência.

Mesmo com as observações microscópicas, até o século XIX, ainda parecia óbvio para as pessoas que o alimento estragado (não vivo) contribuía para o surgimento espontâneo de larvas, pois acreditavam na teoria da geração espontânea ou abiogênese. No ano de 1859, um trabalho do químico francês Louis Pasteur e do físico inglês John Tyndall trouxe evidências de que os microrganismos presentes em infusões eram destruídos pelo calor em fervura. Logo em seguida, ao aquecer vinho por volta de 56 °C por 30 minutos, na ausência de oxigênio, Pasteur verificou que os microrganismos morriam, desenvolvendo a técnica da pasteurização, que utilizamos até hoje (BLACK, 2016).

Avançando um pouco na história da microbiologia, já no final da década de 1870, o médico Robert Koch, contemporâneo de Pasteur, passou a observar e interessou-se por uma doença que andava sendo comum entre fazendeiros e em seus animais. Com análise do sangue dos pacientes em microscópio, ele visualizou um microrganismo de grandes dimensões e supôs que esse poderia ser o agente causador da doença. Durante seus estudos, Koch desenvolveu técnicas microbiológicas em laboratório improvisado e conseguiu isolar a bactéria.

Koch foi responsável ainda pela formulação de quatro **postulados**, publicados entre os séculos XVIII e XIX, para associar um organismo

em particular com uma doença específica. De acordo com Black (2016), os postulados de Koch são os seguintes:

1. O agente causador específico deve ser encontrado em todos os casos da doença.
2. O organismo causador da doença deve ser isolado em cultura pura.
3. A inoculação de uma amostra de cultura em um ser vivo saudável e susceptível deve fazer com que este animal desenvolva a mesma doença.
4. O organismo causador da doença deve ser reisolado a partir do animal inoculado e crescer em cultura pura.



Assimile

Os **postulados de Koch** foram os responsáveis por fornecer aos cientistas um método para estabelecer a teoria da origem das doenças. Esses postulados podem ser aplicados, inclusive, em nossa área de interesse, que é a agrícola, veja:

1. O microrganismo deve ser encontrado nas lesões das plantas doentes.
2. O microrganismo precisa ser isolado e cultivado em uma cultura pura.
3. O microrganismo isolado deve reproduzir os mesmos sintomas da planta doente quando inoculado em uma planta sadia.
4. Para confirmação do microrganismo como agente causal da doença, ele deve ser reisolado da planta inoculada artificialmente e corresponder, em todas as suas características, com o isolado da planta doente.

Além disso, nesse período se iniciaram o desenvolvimento das técnicas básicas de microbiologia como esterilização de material, purificação de culturas microbianas, o uso do agar como base para os meios de cultura bem como a coloração de bactérias, todas essas técnicas utilizadas até a atualidade, com aprimoramentos.

Assim, a microbiologia é o estudo dos microrganismos na faixa microscópica, que pode ser medida em micrômetros, no caso de bactérias e protozoários ou nanômetros, no caso da maioria dos vírus. Em sua área básica, essa disciplina estuda suas propriedades

(sejam elas morfológicas, fisiológicas ou bioquímicas), suas características genéticas, ecológicas, seu potencial patogênico e sua classificação.

Além disso, podemos realizar todos esses estudos citados de maneira aplicada, estudando o controle e o uso dos microrganismos de maneira benéfica nos processos industriais, no controle de pragas e de doenças ou na produção de alimentos, por exemplo, que será exatamente o foco de nossa disciplina: a aplicação da microbiologia básica na área agrícola.

A microbiologia agrícola e do solo nasceu juntamente com outros ramos da microbiologia. Na segunda metade do século XIX os pesquisadores Boussingault, Lawes e Gilbert tentaram comprovar a fixação biológica do nitrogênio atmosférico (FBN) em leguminosas, entretanto, não obtiveram sucesso, uma vez que não conseguiram estabelecer a relação entre a FBN e os nódulos das raízes das plantas. Havia ainda uma linha de oposição que afirmava que “só adubos fornecem os elementos encontrados nas cinzas de plantas” (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006, p. IX). Apenas entre os anos de 1886 e 1888 que a fixação biológica do nitrogênio foi comprovada, e o pesquisador Beijerinck pôde isolar as bactérias responsáveis por tal processo dos nódulos das raízes de leguminosas.

No século XX surgiram os primeiros livros que relacionavam a microbiota do solo com processos importantes para produtividade agrícola, quando ocorreram por exemplo, descobertas de antibióticos e sua aplicação. Na década de 1940, Selman Waksman, uma microbiologista do solo ganhou, inclusive, o Prêmio Nobel de Medicina por ter descoberto a estreptomicina. Enquanto isso, no Brasil, foi criado o 1º Laboratório de Microbiologia Agrícola, localizado no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Segundo Moreira e Siqueira (2006), no final da década de 1950 e início dos anos 60, o mundo encontrava-se no auge da produtividade agrícola resultante do avanço científico e tecnológico dos agroquímicos, do cultivo intensivo do solo e do melhoramento genético, período conhecido como “Revolução Verde”. Posteriormente, já na década de 70, começam então a surgir os primeiros efeitos desse sistema de produção, ditando novos desafios para uma produção mais sustentável. Nesse período,

fortalece-se então o potencial da microbiologia agrícola e do solo. Hoje, ela abrange as áreas de fitopatologia (tanto da parte aérea quanto das raízes) e a qualidade/sanidade de sementes, bem como os microrganismos benéficos, por exemplo.



Exemplificando

Como exemplos de atividades realizadas no campo da Microbiologia agrícola pela EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), podemos citar:

- Diagnóstico de doenças por meio de ferramentas tradicionais e moleculares.
- Identificação e estudo de fitopatógenos.
- Seleção e caracterização de inimigos naturais de fitopatógenos (controle biológico de doenças).
- Seleção e caracterização de microrganismos fixadores de nitrogênio (EMBRAPA, 2018).

Mas afinal, quais são os principais microrganismos estudados pela microbiologia e quais aqueles são de interesse agrícola?

Os principais grupos de organismo estudados pela microbiologia são as bactérias, os fungos, os protozoários e os vírus. Eles estão abundantemente distribuídos na natureza e possuem representantes de interesse agrícola em todos esses grupos. Além desses organismos do domínio da microbiologia propriamente dita, podemos ainda incluir nos estudos da microbiologia agrícola os nematoides, pois possui representantes microscópicos de grande importância para a nossa área de atuação.

A célula é a menor e a principal unidade estrutural e funcional de todos os organismos vivos. Esse é o motivo pelo qual todos eles são formados por células, desde as formas de vida mais simples, que possuem uma única célula (seres unicelulares) aos organismos mais complexos com milhares delas (seres pluricelulares).

Começando pelas bactérias (Figura 1.1 (a)) elas são organismos unicelulares que podem possuir formato esférico (cocos), em bastão (bacilos) ou em espiral (espirilos), sendo que algumas delas ainda podem formar filamentos (BLACK, 2016). A maioria das bactérias é tão pequena que só pode ser observada com um microscópio

óptico em grande aumento (lente objetiva de 100x). Elas podem ser encontradas em uma infinidade de ambientes e substratos, desde os mais comuns aos mais extremos em termos de temperatura e umidade, sendo dispersadas principalmente por contato ou por meio da água. Ao contrário do que a maioria das pessoas acreditam, apenas algumas ocasionalmente causam doenças em animais e vegetais. Na agricultura, as bactérias podem apresentar importância fitopatológica, causando doenças, biotecnológicas, transferindo material genético para melhoramento vegetal ou utilizadas para controle de insetos-praga.

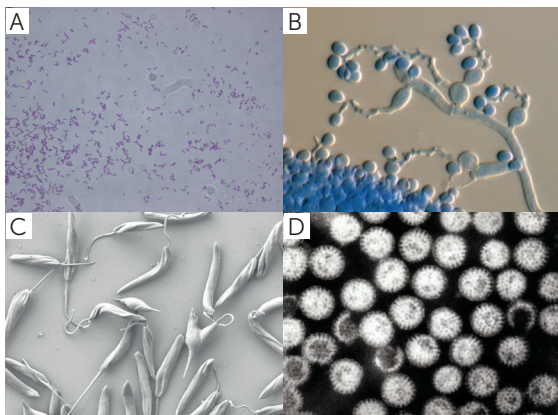
Além das bactérias, nessa disciplina ainda estudaremos de maneira mais detalhada os fungos (Figura 1.1 (b)), que são seres que podem ser unicelulares microscópicos (como as leveduras) ou pluricelulares e macroscópicos (como os cogumelos, por exemplo). Todos os fungos absorvem seus nutrientes do ambiente, podendo ser encontrados amplamente na água e no solo, como elementos decompositores de organismos mortos, sendo importantes organismos na ciclagem de nutrientes, devolvendo-os para o solo. Os fungos se adaptam bem a ambientes úmidos e com temperaturas amenas, sendo dispersados, na maioria das vezes, pelo vento e pela água. Eles são importantes causadores de doenças em animais e vegetais, mas também podem ser utilizados, por exemplo, na produção de antibióticos. Na agricultura, eles podem apresentar importância fitopatológica, causando prejuízos às culturas, como também proporcionar aumento de produtividade, realizar o controle de pragas e doenças, ser fundamental nos processos de fermentação e produção de alimentos na agroindústria ou ainda ser alimento, como a levedura que alimenta animais e os cogumelos comestíveis para os seres humanos.

Os protozoários (Figura 1.1 (c)), por sua vez, também são organismos unicelulares, assim como as bactérias, entretanto, algumas espécies são grandes o suficiente para serem vistas a olho nu. Muitos protozoários obtêm seu alimento englobando ou ingerindo microrganismos menores, podendo se mover ou não. Eles são encontrados em muitos ambientes aquáticos e no solo, podendo causar doenças tanto em animais quanto em espécies vegetais, entretanto, embora muitos protozoários possam ser encontrados no floema de plantas doentes, segundo Trigiano et al. (2010), ainda não existem quantidades necessárias de provas

formais de sua patogenicidade pois os postulados de Koch não foram satisfeitos.

Por fim, os vírus, são agentes ou partículas infecciosas acelulares. Vimos que a célula é a menor e a principal unidade estrutural e funcional de todos os organismos vivo, certo? Pois então, os vírus são uma exceção a essa "regra"; entretanto, estudados pela microbiologia e de grande importância agrícola. Eles são organizados de uma maneira bem mais simples que uma célula e muito pequenos para serem visualizados em microscópio óptico, fazendo com que a única maneira de os observar seja em microscópio eletrônico (Figura 1.1 (d)). Os vírus também podem estar presentes em uma infinidade de ambientes, desde os mais comuns aos mais extremos, possuindo uma grande capacidade de sobrevivência. Entretanto, apesar dessa capacidade, os vírus podem se replicar e exibir suas propriedades quando se encontram dentro de células vivas. Transmitidos por insetos ou por materiais propagativos de enxertia, muitos vírus podem invadir células animais e vegetais, causando doenças, entretanto, na agricultura, além dessa importância fitopatológica, eles também podem ser utilizados no controle de pragas.

Figura 1.1. | Exemplos de seres microscópicos



Legenda: (a) Bactéria fitopatogênica *Rhodococcus fascians* vista ao microscópio óptico (40x); (b) fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* visto ao microscópio óptico (40x); (c) Protozoário fitopatogênico *Phytomonas* visto ao microscópio eletrônico; (d) Rotavírus visto ao microscópio eletrônico.

Fonte: (A) <https://en.wikipedia.org/wiki/Rhodococcus_fascians>; (B) <<https://www.flickr.com/photos/usdagov/14675998293>>; (C) <http://data.gate2biotech.com/editor_images/Adri_zivot_bez_hemu.jpg>; (D) <https://en.wikipedia.org/wiki/Rotaviral_gastroenteritis#/media/File:Multiple_rotavirus_particles.jpg>. Acesso em: 27 fev. 2018.



Reflita

Se os microrganismos estão presentes em quase todos os tipos de ambientes, o que poderia limitar ou impedir o seu desenvolvimento em um determinado local?

Você deve ter percebido que os microrganismos fazem parte do meio ambiente e podem ser encontrados em praticamente todos os ambientes em que frequentamos, inclusive em nós mesmos. Entretanto, a diversidade dos microrganismos no ambiente, independentemente do grupo ao qual pertence, dependerá de um conjunto de fatores que podem ser bióticos ou abióticos. Os fatores bióticos são aqueles relacionados aos seres vivos e suas relações com o meio em que vivem, podendo ser exemplificados pela genética do organismo ou a sua própria interação com os demais, por exemplo. Já os fatores abióticos são aqueles relacionados a elementos não vivos do ambiente como a temperatura, a água, o pH e as fontes nutricionais, por exemplo. Esses fatores podem influenciar tanto positivamente quanto negativamente no desenvolvimento de um microrganismo, dependendo da intensidade em que eles ocorrem e das características do ser.



Exemplificando

Vamos considerar, por exemplo, um determinado microrganismo benéfico utilizado no controle de pragas agrícolas. Sabendo-se que esse microrganismo se adapta bem em ambientes úmidos e temperaturas amenas, para que se tenha sucesso no plano de controle da praga-alvo, é preciso realizar a aplicação de tal agente de controle em condições ambientais favoráveis a ele, não é mesmo? Caso a aplicação seja realizada em uma tarde sem chuvas, no período mais quente e com maior exposição solar do dia, meu controle não será efetivo. Isso ocorrerá porque as condições ambientais serão desfavoráveis à biologia do ser que está sendo utilizado.

No contexto agrícola, os fatores abióticos são aqueles mais importantes para as bactérias e fungos e que serão estudados com maior detalhamento por nós. Já para os vírus, daremos uma maior atenção aos fatores bióticos. Para que você entenda como é importante conhecer as características de um microrganismo e

os fatores que influenciam seu crescimento, veremos que a oferta de nutrientes é um dos principais fatores que limita uma bactéria. Entretanto, existem outros fatores influenciáveis no crescimento bacteriano como a temperatura, o pH, e a disponibilidade de oxigênio.

Já para os fungos, a temperatura, a umidade e a radiação solar podem ser fatores essenciais, uma vez que sua temperatura ótima de crescimento é mais amena quando comparada às bactérias. Em relação às temperaturas de crescimento, é importante saber que existem três níveis para cada microrganismo: a temperatura mínima, a temperatura ótima e a temperatura máxima. Nessa última, as enzimas do ser são danificadas pelo calor e suas células paralisam suas funções (VIEIRA; FERNANDES, 2012). De acordo com Vieira e Fernandes (2012), de maneira geral, a temperatura ótima para todos os fungos está entre 20 °C – 30 °C, embora esse número possa variar entre diferentes espécies.

Para os vírus, por sua vez, um importante fator é a presença de um outro ser, uma vez que eles são parasitas intracelulares obrigatórios, ou seja, os vírus são dependentes de uma célula para se reproduzir. Desta forma, na ausência de outro ser vivo, seja unicelular ou pluricelular, sua disseminação é inviabilizada. Importante saber que diferentes vírus podem infectar qualquer ser vivo, entretanto, a maioria deles é limitada a somente um hospedeiro e a células específicas desse hospedeiro (BLACK, 2016).

Estamos chegando ao fim desta seção que foi apenas o primeiro passo para imergir você no universo da microbiologia. Ainda, nesta primeira unidade, você terá todo o subsídio necessário para conhecer os conceitos iniciais e principais aplicações da microbiologia agrícola. Assim, a partir da unidade 1 poderemos avançar no conteúdo e nos aprofundar no mundo de cada grupo de microrganismos e suas aplicações na agricultura na agroindústria.



Pesquise mais

Gostou do tema dessa seção e quer conhecer um pouco mais sobre o surgimento da microbiologia e suas áreas de estudo? Acesse o material intitulado *Introdução à microbiologia* e conheça um pouco mais sobre a área e seus principais marcos:

AVILA-CAMPOS, Mario J. **Introdução à Microbiologia**. Arquivos de

aulas. 2016. Disponível em: <http://www.icb.usp.br/bmm/mariojac/arquivos/Aulas/Introducao_Microbiologia_Texto.pdf>. Acesso em: 4 mar. 2018.

Sem medo de errar

Vimos nessa seção que os microrganismos fazem parte do meio ambiente e podem ser encontrados em uma infinidade de lugares, sendo importantes para a nossa saúde e para a nossa área de interesse profissional.

Para vivenciar uma aplicação desses conhecimentos, iniciamos esta seção apresentando um dia rotineiro de trabalho em que você poderá se deparar futuramente em seu dia a dia. Como agrônomo de uma usina do setor sucroenergético, enquanto percorria as áreas de cana com o assistente técnico, você notou, em uma fazenda específica, que algumas folhas apresentavam lesões específicas que talvez se tratassem de deficiência nutricional, entretanto, perceberam que seus dedos ficaram “sujos” com algo que se parecia muito com poeira da estrada.

Como bom profissional, você analisou a área da propriedade e notou uma grande intensidade de ventos e o solo bem úmido, identificando que se tratava de ferrugem alaranjada, uma doença ocasionada por fungo. O assistente técnico que te acompanha não consegue entender como você chegou a essa conclusão tão rápido e fez alguns questionamentos: caso você não conhecesse essa doença, quais seriam as etapas para provar que esse fungo específico é a causa da doença e confirmar que as lesões estão mesmo sendo mesmo ocasionada por ele? O que pode ter favorecido esse fungo ter se instalado aqui?

Para auxiliar a confirmação de agentes causais de doenças, existem os postulados de Koch, publicados por Robert Koch entre os séculos XVIII e XIX. Estes postulados são utilizados até os dias atuais e se tornaram um método para estabelecer a teoria da origem de quaisquer doenças. Na área agrícola e mais especificamente na situação estudada, esses postulados poderiam ser aplicados no sentido de isolar e identificar o microrganismo que está ocasionando a lesão na cana, além de confirmar se ele é, realmente, o agente

causal da mesma por meio das seguintes etapas:

1. Encontrar o microrganismo específico nas lesões das plantas doentes.
2. Isolar-lo e cultivá-lo em uma cultura pura.
3. Inocular o microrganismo isolado em uma planta sadia, verificando se ele reproduz os mesmos sintomas da planta doente.
4. Para confirmar se o microrganismo é mesmo agente causal da doença, ele deve ser reisolado da planta inoculada artificialmente e corresponder, em todas as suas características, com o isolado da planta doente crescendo novamente em cultura pura.

Após encontrar e confirmar o microrganismo como agente causal da doença, seria preciso identificar a qual grupo ele pertence e quais as características desse grupo, a fim de entender os fatores que poderiam ter favorecido com que ele se instalasse na região.

Sabendo-se que se trata de um fungo, e que esse grupo de microrganismos se adapta bem a ambientes úmidos e com temperaturas amenas, se dispersando por meio dos ventos, deduzimos que as condições da área de cana estudada poderão proporcionar uma boa adaptação a este fitopatógeno, caso continue com ventos (fator de dispersão) e solo úmido (fator de adaptação), devido à recorrência das chuvas.

Avançando na prática

Bactérias ou vírus?

Descrição da situação-problema

A cultura do milho é a principal fonte de renda das famílias de uma comunidade rural da região em que você vive e, na última safra, foi prejudicada por uma doença que atingiu a toda comunidade. Os produtores, sem saberem as reais causas da doença e o que fazer para controlá-la, convidaram você, engenheiro agrônomo, para visitar o local e propor a medida mais adequada para controle da doença. Nessa visita, você com larga experiência, constatou ser uma doença virótica transmitida por inseto, entretanto, os produtores

afirmavam que a causa era uma bactéria. Sem entender muito bem qual a diferença entre esses dois grupos de fitopatógenos, um dos representantes da comunidade solicitou que você explicasse de maneira simples as características de cada um. Como você faria essa orientação?

Resolução da situação-problema

De maneira simples, você pode explicar que as bactérias são organismos formados por uma única célula, que podem possuir formato esférico, em bastão ou em espiral. A maioria delas é tão pequena que só pode ser observada com um microscópio óptico com aumento de 100x. Elas podem ser encontradas em uma infinidade de ambientes e substratos, desde os mais comuns aos mais extremos, sendo dispersadas principalmente por contato ou por meio da água. Já os vírus, diferentemente das bactérias e de todos os outros seres vivos, não são formados por células, possuindo uma configuração especial. Eles são organizados de uma maneira bem mais simples e muito pequenos para serem visualizados em microscópio óptico, fazendo com que a única maneira de os observar seja em microscópio eletrônico. Eles também podem estar presentes em uma infinidade de ambientes e possuem uma grande capacidade de sobrevivência. Entretanto, apesar dessa capacidade, os vírus só podem se replicar e exibir suas propriedades quando se encontram dentro de células vivas. Eles são transmitidos, por exemplo, por insetos ou por materiais propagativos de enxertia.

Faça valer a pena

1. Pode-se afirmar que os antigos gregos, romanos e judeus contribuíram para o entendimento do processo de disseminação das doenças, entretanto, os avanços nos estudos da microbiologia só foram possíveis com o desenvolvimento de lentes de alta qualidade que tornaram possível observar os microrganismos.

Assinale a seguir a alternativa que contém o nome dos primeiros pesquisadores a realizarem a visualização de células ao microscópio:

- a) Leeuwenhoek e Pasteur.
- b) Hooke e Leeuwenhoek.
- c) Pasteur e Metchnikoff.
- d) Koch e Pasteur.
- e) Metchnikoff e Hooke.

2. Koch desenvolveu quatro postulados que ajudaram no estabelecimento definitivo da teoria germinal das doenças, e até hoje são utilizados como base para os métodos de identificação, isolamento e confirmação que um determinado organismo é realmente o agente causal da doença. Trata-se dos Postulados de Koch.

Os postulados seguir encontram-se fora de ordem, analise-os e numere conforme a sequência correta:

- () O organismo causador da doença deve ser isolado em cultura pura.
- () O organismo causador da doença deve ser recuperado a partir do animal inoculado.
- () A inoculação de uma amostra de cultura em um ser vivo saudável e susceptível deve fazer com que este animal desenvolva a mesma doença.
- () O agente causador específico deve ser encontrado em todos os casos da doença.

Assinale a alternativa que apresenta a sequência que preenche corretamente as lacunas do texto-base:

- a) 2 – 4 – 3 – 1.
- b) 4 – 1 – 3 – 2.
- c) 3 – 2 – 1 – 4.
- d) 2 – 3 – 4 – 1.
- e) 4 – 2 – 1 – 3.

3. Analise a afirmação a seguir:

A diversidade dos microrganismos no ambiente, independentemente do grupo ao qual pertence, dependerá de um conjunto de fatores que podem ser bióticos ou abióticos. Os fatores bióticos são aqueles relacionados aos seres vivos e suas relações com o meio em que vivem. Já os fatores abióticos são aqueles relacionados a elementos não vivos do ambiente.

Assinale a alternativa que apresenta um fator essencial para o desenvolvimento e disseminação dos vírus:

- a) Temperaturas altas.
- b) Umidade baixa.
- c) Radiação solar.
- d) pH neutro.
- e) Interação com seres vivos.

Seção 1.2

Efeitos das ações dos microrganismos

Diálogo aberto

Embora entendemos os microrganismos como potenciais causadores de doenças, apenas 1% deles são patogênicos (BLACK, 2016). Dentro os demais temos, por exemplo, aqueles que decompõem organismos mortos e produtos da excreção de outros seres vivos, tornando o nitrogênio disponível às plantas. Além disso, os microrganismos ainda podem residir no trato digestivo dos animais, desempenhando um importante papel na digestão. Também são responsáveis por decompor alguns resíduos industriais, pois são utilizados como parte do processo de produção de alimentos ou ainda ser o próprio alimento de animais e de seres humanos.

Para expandir nossos horizontes e enxergar um novo efeito dos microrganismos no ambiente, vamos retornar ao contexto em que você é um dos engenheiros agrônomos de uma usina sucroalcooleira. Como vimos, a área de desenvolvimento agrônomo vem sendo destaque na empresa, pois permite maior eficiência para a produção canavieira. Esta é a área em que você trabalha, sendo o gestor responsável pelo levantamento e controle de pragas e doenças da cana-de-açúcar.

Participando de um encontro de empresas do setor sucroenergético, muito foi discutido sobre métodos para aumentar a sustentabilidade do setor, principalmente em relação ao controle de pragas. Você, sempre antenado em novidades, reconhece que o controle biológico de pragas vem sendo amplamente utilizado pelas usinas da região, trazendo bons resultados em termos de controle de pragas, além de servir como estratégia competitiva do produto no mercado, em virtude da crescente preocupação dos consumidores com a questão ambiental.

Tomada a decisão por implantar o controle biológico como uma das técnicas de manejo integrado na produção de cana da usina em que trabalha, você percebe que precisa pesquisar um pouco sobre o controle microbiano, a fim de traçar estratégias para fomentar seu

projeto. Como o conhecimento de microbiologia agrícola poderá te auxiliar nesse projeto? Quais seriam os efeitos dos microrganismos sobre as pragas? E para o meio ambiente? Como isso se reverteria em lucro para a usina?

A partir de agora você terá subsídios para responder essas dúvidas e estruturar o seu projeto de implantação do controle microbiano de pragas no seu setor, uma vez que conheceremos diferentes ações dos microrganismos na agricultura e, dentre elas, a capacidade de controle de pragas e doenças das culturas.

Não pode faltar

Estamos conhecendo, nessa unidade, uma perspectiva geral da microbiologia, antes de adentrarmos especificamente na área agrícola, de nosso interesse profissional. Já sabemos que os microrganismos são encontrados de maneira participativa em diferentes ambientes, sendo que a maioria é direta ou indiretamente benéfica a outros organismos e ao meio.

Começando por aqueles que mais nos preocupam, os microrganismos patogênicos, também chamados de patógenos, são aqueles responsáveis por causar doenças, tirando os seres vivos de seu estado de normalidade e provocando, na maioria das vezes, prejuízos, seja na saúde humana ou no ramo agrícola.

Muito diferente daqueles que são encontrados em maior quantidade em nosso cotidiano, os microrganismos patogênicos além de serem capazes de produzir infecção em seus hospedeiros, ainda podem produzir compostos tóxicos, sendo transmitidos pelo ar, pela água, pelo contato ou pelo consumo de alimentos contaminados.



Assimile

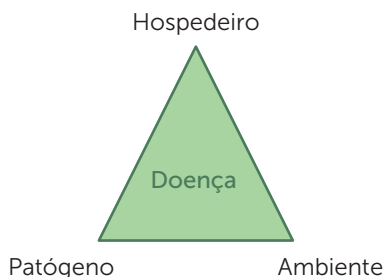
Quando falamos em microrganismos patogênicos, dois conceitos de uso comum se fazem necessários para um bom entendimento:

- **Patogenicidade:** é a capacidade de um microrganismo em infectar e causar danos/doença em determinado hospedeiro.
- **Virulência:** é a taxa de quanto um microrganismo pode infectar e causar danos/doença em determinado hospedeiro (TRIGIANO et al., 2010).

Note que ambos conceitos estão relacionados à capacidade de um determinado organismo em causar danos ao seu hospedeiro, entretanto a patogenicidade é um fator qualitativo, enquanto a virulência é um fator quantitativo. Isso significa que a patogenicidade está ligada ao fato de o microrganismo possuir ou não a capacidade de causar doença, enquanto a virulência irá quantificar essa capacidade (geralmente estimada em porcentagem).

O patógeno, o hospedeiro e o ambiente são fatores essenciais para que uma doença possa se desenvolver em um ser vivo. As doenças, representadas pela Figura 1.2, são dependentes desses três componentes, sendo resultado da interação entre eles (TRIGIANO et al., 2010).

Figura 1.2 | Triângulo da doença



Fonte: adaptada de Trigiano et al. (2010, p. 26).

Na lavoura, os ataques de microrganismos patogênicos também podem causar perdas em plantações inteiras e grandes prejuízos econômicos. A maioria dos microrganismos fitopatogênicos, como aqueles causadores de ferrugem, estrias e podridão em diferentes culturas, passa parte de seu ciclo de vida hospedados nas próprias plantas, no solo ou em matéria orgânica em decomposição. Na pecuária, microrganismos patogênicos como os causadores da febre maculosa e da mastite, por exemplo, são importantes pois, dependendo do tipo, podem ocasionar doenças que diminuem a fome e disposição dos animais de corte, causando sua morte ou tornando sua carne imprópria para consumo.

Já nos seres humanos podemos citar como exemplos de

doenças causadas por microrganismos patogênicos a tuberculose, o tétano, a pneumonia e a sífilis, dentre outras. Para os seres humanos é importante destacar que os patógenos podem estar presentes em alimentos, sendo estes responsáveis pela transmissão de algumas doenças e ainda toxinfecções alimentares. Este é um dos motivos pelos quais é importante aplicar os conhecimentos de microbiologia também no controle da produção de alimentos, garantindo a biossegurança e mitigando o contágio em geral.

O motivo pelo qual os alimentos são grandes fontes de microrganismos é que eles possuem uma grande quantidade de nutrientes, fornecendo condições ideais para o seu crescimento. Uma vez que a maioria dos alimentos consumidos por nós deriva dos vegetais que são produzidos no solo ou é oriunda dos animais que vivem no solo, é natural que eles estejam contaminados com organismos do solo. As formas de manuseio e armazenamento dos itens alimentares para consumo humano também são responsáveis por grande parte da contaminação.

Assim, de maneira geral, os microrganismos presentes nos alimentos não irão nos causar efeitos visivelmente negativos, uma vez que eles, em geral, não são patogênicos a nós. Entretanto, em outros casos eles podem causar a deterioração dos alimentos, como quando há alteração de aparência, cheiro e sabor (BLACK, 2016). Essa deterioração pode favorecer a contaminação por microrganismos patogênicos e, estes sim, poderão nos causar intoxicações e doenças.



Exemplificando

O peixe fresco, geralmente, é contaminado com muitos microrganismos como bactérias, vermes, vírus e parasitas. Muitos desses organismos sobrevivem até mesmo ao armazenamento em gelo picado, especialmente se forem empacotados de maneira compactada ou armazenados em engradados contaminados. Essa vulnerabilidade em relação às contaminações, levou ao surgimento de rígidos programas de segurança de alimentos que visam a identificação e prevenção de doenças transmitidas por alimentos (BLACK, 2016).

Em contrapartida, a multiplicação de microrganismos em alimentos nem sempre será um processo negativo. Algumas bactérias e fungos fermentadores permitem que possamos produzir pão, derivados do leite como iogurtes e queijos, cervejas, vinhos, etc. Além de nos ajudarem na produção de alimentos, fungos e bactérias podem ainda servir de alimento tanto a nós quanto aos animais.

Um outro grupo de microrganismos é capaz de garantir o fluxo dos nutrientes através dos ecossistemas. Trata-se dos seres decompositores, que realizam seus processos vitais essenciais de maneira a incorporar moléculas de água, carbono, nitrogênio e outros elementos ao ambiente em que vivem (BLACK,2016); isso é possível porque o mecanismo de reciclagem dos nutrientes produzidos pelos vegetais, a partir da absorção da energia solar, acontece em circuitos fechados.



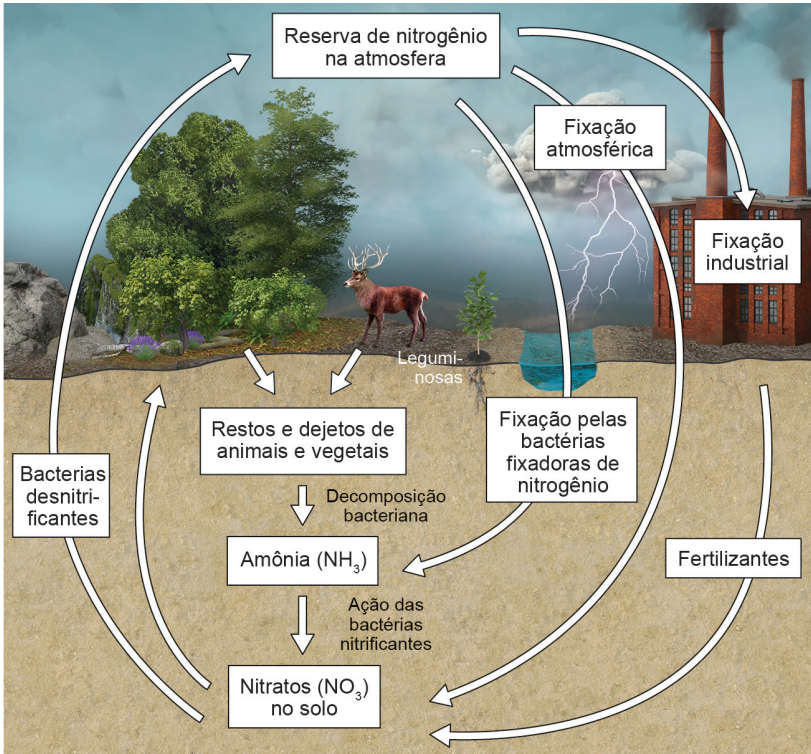
Assimile

A esses mecanismos pelos quais a reciclagem de nutrientes ocorre, com ajuda dos microrganismos, chamamos de **ciclos biogeoquímicos**, em que *bio* se refere aos seres vivos e *geo* se refere à Terra, como meio ambiente onde se encontram os seres vivos. Aqui nessa seção estudaremos, especificamente, a importância dos microrganismos para os ciclos do nitrogênio, do carbono, do enxofre e do fósforo, uma vez que esses elementos são fundamentais para a agricultura.

Você sabia que o componente predominante da atmosfera é o gás nitrogênio? Para que esse elemento seja aproveitado, são possíveis três caminhos: a fixação atmosférica, realizada por meio dos raios, a fixação industrial, que acontece quando produzimos os fertilizantes e a fixação biológica, que é realizada por meio de bactérias de vida livre ou encontradas em simbiose com plantas – principalmente nas leguminosas como o feijão, soja e amendoim.

Conseguiu identificar onde os microrganismos se encaixam nesse ciclo? Veja na Figura 1.3 que as bactérias são responsáveis tanto pela reciclagem do nitrogênio da matéria orgânica quanto pela fixação do nitrogênio presente na atmosfera. Além disso, eles ainda estão presentes no processo contrário à fixação, que é a desnitrificação, em que bactérias também são responsáveis por devolver nitrogênio gasoso para a atmosfera.

Figura 1.3 | Ciclo do nitrogênio



Fonte: Black (2016, p. 666).

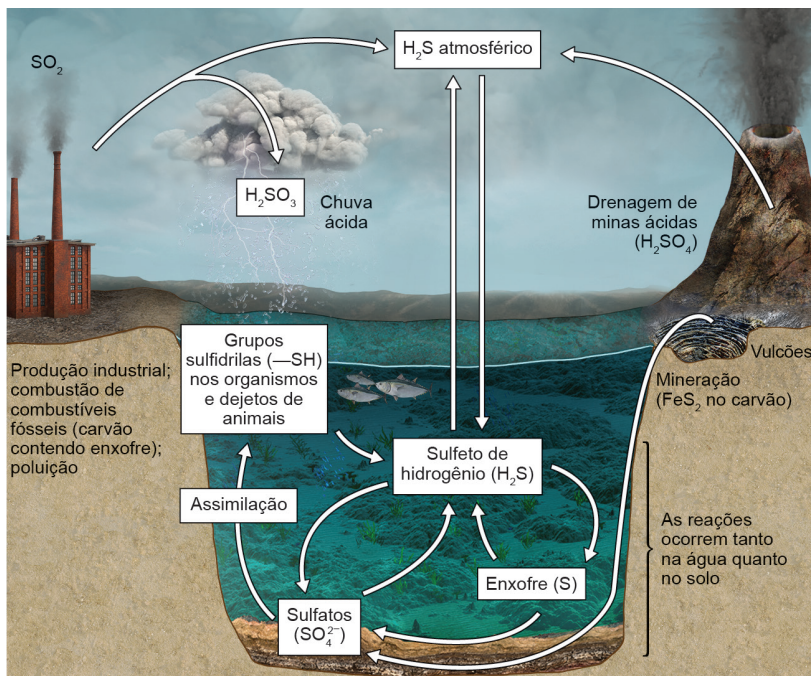
Outro ciclo em que os microrganismos são importantes é o ciclo do carbono. Esse elemento é encontrado nos oceanos, na vegetação, nos solos e na atmosfera, sendo que, nesta última, ele se encontra em forma de dióxido de carbono, também conhecido como gás carbônico. O carbono proveniente do dióxido de carbono atmosférico é absorvido pelas espécies vegetais durante a fotossíntese e é absorvido pelos seres consumidores quando elas se tornam alimento. Esse gás retorna à atmosfera pela respiração dos seres vivos e pela ação dos microrganismos decompositores na matéria orgânica.

Em relação ao ciclo do carbono é importante saber que todos os organismos necessitam de alguma fonte de carbono para sobreviver. Como a atmosfera contém uma quantidade limitada de dióxido de carbono, a reciclagem realizada pelos microrganismos é

essencial para a manutenção de um fornecimento contínuo desse elemento à atmosfera.

Já no caso do enxofre, as maiores reservas são encontradas na litosfera e nos oceanos; entretanto, ele também é disponibilizado à atmosfera por meio da poluição industrial e da combustão de combustíveis fósseis. Uma peculiaridade sobre esse elemento é que, apesar de ser importante e essencial para as plantas, ele é escasso nos seres vivos e na atmosfera, quando comparado aos demais. As bactérias envolvidas no ciclo do enxofre são classificadas de acordo com a função que exercem, sendo a redução de sulfato, a redução de enxofre e a oxidação de enxofre, conforme a Figura 1.4.

Figura 1.4 | Ciclo do enxofre



Fonte: Black (2016, p. 670).

Por fim, o fósforo é outro elemento que também se move ciclicamente através dos ecossistemas. Os resíduos de animais (fezes, urina, matéria orgânica) e de plantas são degradados por decompositores que liberam fósforo no solo, os microrganismos

atuam neste ciclo de duas maneiras: eles transformam fosfatos orgânicos dos organismos em decomposição em fosfatos inorgânicos, e ainda convertem esses fosfatos inorgânicos em nutriente solúvel em água, podendo ser utilizado tanto por vegetais quanto por outros microrganismos. Segundo Black (2016), essas funções são essenciais para os ecossistemas pois o fósforo é frequentemente um nutriente limitante em alguns ambientes.



Refleta

Como seriam os ciclos biogeoquímicos caso os microrganismos decompositores não existissem? Poderíamos chamá-los de ciclos?

Os microrganismos ainda podem nos proporcionar um efeito positivo como método de controle de pragas e doenças agrícolas, você sabia?

O uso indiscriminado de agrotóxicos para o controle de pragas e doenças nas lavouras vem ocasionando diversos problemas, como a contaminação do solo, da água e dos alimentos com resíduos. Além disso, esse uso indiscriminado pode causar a resistência de pragas e patógenos às formulas utilizadas com frequência, assim como a mortalidade de organismos benéficos (chamados inimigos naturais) e a consequente diminuição da biodiversidade, por exemplo.

Nesse contexto, como uma área de estudo da microbiologia agrícola, temos o controle microbiano de pragas e doenças que se trata da utilização de microrganismos como bactérias, fungos e vírus para o controle dos insetos, ácaros e patógenos que causam danos econômicos nas culturas agrícolas. No caso das pragas, esse controle acontece devido à capacidade destes microrganismos em causar doenças em insetos, sendo chamados de entomopatógenos (*entomo*, relacionado a insetos, e *patógenos* relaciona-se à capacidade de causar doenças).

Essa técnica é uma das possibilidades dentro do Manejo Integrado de Pragas (MIP) e visa a diminuição do uso de inseticidas, sendo vantajosa tanto do ponto de vista sanitário quanto dos pontos de vista ambiental e econômico, uma vez que possui baixo custo. De acordo com Alves (1998), essa alternativa é eficiente, possui facilidade de utilização, preserva os inimigos naturais e ainda reduz o impacto dos inseticidas sobre o meio ambiente.



O Manejo Integrado de Pragas (MIP) utiliza como base o uso de várias estratégias de controle de insetos, mantendo-os abaixo do nível de dano econômico em uma cultura. Dentre essas estratégias, podemos citar o uso de plantas resistentes, a aplicação de inseticidas seletivos aos inimigos naturais bem como o uso do controle biológico com outros insetos ou microrganismos entomopatogênicos (VALICENTE, 2009).

Assim, o controle microbiano de pragas, também chamado de controle biológico com entomopatógenos é realizado com a utilização de bactérias, fungos, vírus, nematoides e protozoários no controle de insetos indesejáveis. Segundo Valicente (2009), ainda não há relatos no Brasil do uso de protozoários em grande escala, em contrapartida, os fungos são amplamente utilizados como estratégia de controle no em todo o mundo, juntamente com as bactérias e os vírus. A maioria das espécies de microrganismos entomopatogênicos é capaz de produzir infecções caracterizadas pela diminuição das atividades vitais do inseto, matando-os lentamente. Alguns exemplos de sucesso em controle microbiano de pragas no Brasil são a utilização do fungo *Metarhizium anisopliae* para controle das cigarrinhas das raízes e das folhas da cana-de-açúcar, do vírus *Baculovirus anticarsia* para o controle da lagarta da soja e ainda da bactéria *Bacillus thuringiensis* que já foi, inclusive, utilizada para a criação de variedades transgênicas de soja (*Bacillus thuringiensis*).



Quer conhecer um pouco mais sobre a aplicação dos microrganismos no controle biológico de pragas e os benefícios que eles podem trazer do ponto de vista sanitário, ambiental e econômico para o agronegócio? Não deixe de ler:

- BATISTA FILHO et al. Retrospectiva do controle microbiano de pragas agrícolas no Brasil. **Páginas do Inst. Biol.**, São Paulo. 2013. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/pag/v9_1/batista.pdf>. Acesso em: 14 mar. 2018.
- VALICENTE, F. H. Controle biológico de pragas com entomopatógenos. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte. 2009. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/574316/1/Controlebiologico.pdf>>. Acesso em: 14 mar. 2018.

Assim, chegamos ao fim de mais uma seção em que você pôde conhecer e entender alguns exemplos de efeitos dos quais os microrganismos podem causar; tanto negativos, quanto positivos. O importante ao encerrar essa seção é que você quebre o paradigma que muitos de nós possuímos de que os microrganismos são sempre vilões. Importante ainda que você seja consciente de que esses não são os únicos efeitos, mas talvez aqueles que sejam de maior interesse a nós, visando a área agrícola. Nesse sentido, não deixe de expandir os seus conhecimentos e buscar aprofundamento, pois o universo dos microrganismos é imenso! Vamos em frente?

Sem medo de errar

Como um dos efeitos positivos dos microrganismos às culturas agrícolas, estudamos o controle microbiano de pragas, que nada mais é do que a utilização de microrganismos como bactérias, fungos e vírus para o controle dos insetos e ácaros que causam danos econômicos às lavouras.

Para aplicar o conhecimento adquirido nessa seção, você foi colocado em um cenário profissional onde trabalha na área sucroenergética, mais especificamente, no setor de desenvolvimento agrônomo de uma usina, certo?

Participando de um encontro de empresas do setor, você percebeu que o controle biológico de pragas vem sendo amplamente utilizado pelas usinas da região, trazendo bons resultados em termos de controle de pragas e também preocupação com a questão ambiental. Entretanto, para implantar essa prática na sua empresa, você percebe que precisa pesquisar um pouco sobre o controle microbiano e decide buscar respostas para as seguintes reflexões: como o conhecimento de microbiologia agrícola poderá lhe auxiliar nesse projeto? Quais seriam os efeitos dos microrganismos sobre as pragas? E para o meio ambiente? Como isso se reverteria em lucro para a usina?

O estudo da microbiologia agrícola proporcionou o desenvolvimento do controle microbiano de pragas e doenças. Este, nada mais é do que aproveitar o potencial de alguns microrganismos para o controle dos insetos, ácaros e patógenos prejudiciais às culturas agrícolas, por meio de um efeito positivo.

No caso das pragas, os microrganismos podem causar doenças nos insetos, sendo chamados nestes casos de entomopatógenos (*entomo*, relacionado a insetos e patógenos relaciona-se à capacidade de causar doenças). Estes microrganismos produzem infecções caracterizadas pela diminuição das atividades vitais do inseto, matando-os lentamente. Para ajudar na sua argumentação, você pode citar alguns exemplos de sucesso em controle microbiano de pragas no Brasil, que além da utilização do fungo *Metarhizium anisopliae* para controle das cigarrinhas das raízes e das folhas da cana-de-açúcar, já utiliza o vírus *Baculovirus anticarsia* e a bactéria *Bacillus thuringiensis* para o controle da lagarta da soja.

Por visar a diminuição do uso de inseticidas, essa técnica é vantajosa tanto do ponto de vista sanitário quanto dos pontos de vista ambiental e econômico para as usinas, sendo eficiente, de fácil utilização, baixo custo e ainda evita o impacto dos agrotóxicos sobre o meio ambiente.

No caso da cana-de-açúcar e do nosso cenário hipotético, o controle microbiano seria realizado por meio da utilização do fungo *Metarhizium anisopliae*, entomopatógeno tanto da cigarrinha das raízes (*Mahanarva fimbriolata*) quanto da cigarrinha das folhas (*Mahanarva posticata*), dependendo do estado brasileiro onde se encontra a cultura.

Com essas informações é importante que você estruture suas ideias e prepare uma apresentação com sua proposta para a usina. Lembre-se, como se trata de um projeto novo, você precisa explicar o que são os microrganismos entomopatogênicos, os benefícios econômicos e ambientais, quais são os exemplos já utilizados em outras culturas e qual o microrganismo utilizado para controle das cigarrinhas da cana. Mãos à obra!

Avançando na prática

Como recompor o nitrogênio do solo?

Descrição da situação-problema

Você é o agrônomo recém contratado por uma média propriedade que cultiva arroz no sul do país. O produtor rural decidiu investir há pouco tempo na cultura e ainda não se sente confortável

com as práticas de manejo que deve utilizar, motivo pelo qual você precisa manter a orientação constante. Na última análise de solo da propriedade você verificou uma deficiência de nitrogênio e sabe que esse elemento é essencial para a cultura em questão. Agora você precisa levar essa informação ao produtor rural, juntamente com a sua orientação sobre quais alternativas seriam possíveis para devolver ao solo o nitrogênio que ele perdeu. Conhecendo o ciclo biogeoquímico do nitrogênio, quais possibilidades você daria ao produtor?

Resolução da situação-problema

Para que o nitrogênio seja repostado no solo e disponibilizado para as culturas agrícolas são possíveis dois caminhos: a fixação industrial, que acontece quando produzimos os fertilizantes ou a fixação biológica, que é realizada por meio de bactérias de vida livre ou encontradas em simbiose com plantas. Sendo assim, conhecendo o ciclo do nitrogênio você poderá indicar a compra de fertilizantes industriais ou a rotação de culturas com o plantio de leguminosas como o feijão, soja e amendoim.

Faça valer a pena

1. Na lavoura, os ataques de microrganismos patogênicos podem causar doenças e perdas em plantações inteiras, ocasionando prejuízos econômicos grandes. A maioria microrganismos patogênicos de plantas passam parte de seu ciclo de vida hospedados nas próprias plantas, no solo ou em matéria orgânica em decomposição.

Considerando as informações acima e seus conhecimentos sobre o triângulo das doenças, assinale a alternativa que contém os fatores essenciais para que elas ocorram e se desenvolvam:

- a) Patógeno, pH, umidade.
- b) Patógeno, hospedeiro, ambiente.
- c) Patogenicidade, virulência, hospedeiro.
- d) Patogenicidade, ambiente, virulência
- e) Umidade, pH, luminosidade.

2. Analise as asserções a seguir e a relação proposta entre elas:

- I. Os microrganismos podem causar a deterioração dos alimentos, como quando há alteração de aparência, cheiro e sabor dos mesmos, entretanto a multiplicação de microrganismos em alimentos nem sempre será um processo negativo.

PORQUE

- II. Algumas bactérias e fungos fermentadores permitem que possamos produzir pão, derivados do leite como iogurtes e queijos, cervejas, vinhos, etc., apesar de serem tóxicos e não servirem como alimento.

Agora assinale a alternativa que apresenta a correta relação entre as asserções:

- a) As asserções I e II são corretas e a II justifica a I.
- b) As asserções I e II são corretas e a II não justifica a I.
- c) A asserção I é correta e a II é falsa.
- d) A asserção I é falsa e a II é correta.
- e) As asserções I e II são falsas.

3. O controle microbiano de pragas, também chamado de controle biológico com entomopatógenos, é a utilização de bactérias, fungos, vírus, nematoides e protozoários no controle de insetos indesejáveis. Ele visa a diminuição do uso de inseticidas, sendo vantajoso tanto do ponto de vista sanitário quanto dos pontos de vista ambiental e econômico, uma vez que possui baixo custo.

Assinale a alternativa que apresenta o efeito dos entomopatógenos sobre os insetos:

- a) Ocasionam morte imediata.
- b) Ocasionam paralisia alimentar, sem ocasionar morte.
- c) Ocasionam resistência às plantas, sem ocasionar morte.
- d) Ocasionam repelência imediata, sem ocasionar morte.
- e) Ocasionam diminuição das atividades vitais, matando-os lentamente.

Seção 1.3

Aplicações da microbiologia agrícola

Diálogo aberto

Retomando brevemente o objetivo de nosso estudo, lembre-se de que nessa primeira unidade de ensino estamos conhecendo os fundamentos da microbiologia e suas diferentes aplicações na área agrícola. Para isso, temos utilizado como pano de fundo, o contexto profissional onde você é um dos engenheiros agrônomos de uma usina sucroalcooleira, sendo o gestor responsável pelo levantamento e controle de pragas e doenças da cana-de-açúcar.

O gerente da área industrial da usina procurou você a fim de reportar um problema na produção do etanol. Você inicialmente não entendeu como poderia ajudar, visto que vocês tinham responsabilidades diferentes, e otimizar a produção industrial não era o foco do seu trabalho.

Ao explicar o problema, ele afirmou que a área agrícola era sim muito importante para o sucesso do processo fermentativo da usina, pois a contaminação microbiana vinda da produção agrícola ocasiona perdas significativas na atividade industrial.

Com a explicação do gerente industrial, você se questiona sobre o papel da microbiologia agrícola aplicada ao setor sucroenergético e como seres tão microscópicos poderiam influenciar, tanto de maneira positiva, quanto negativa, na produtividade da empresa. Quais seriam esses microrganismos fermentadores atuantes na produção do etanol? E como a área agrícola poderia ser tão importante para o sucesso da fermentação industrial? Quais seriam as demais indústrias onde os microrganismos poderiam ser importantes?

Para finalizar nossa primeira unidade dessa disciplina e você conseguir identificar os efeitos positivos e negativos que os microrganismos podem causar no setor agrícola, conheceremos algumas áreas de atuação dessa área do conhecimento, permitindo que você responda seus questionamentos e também faça aplicações no contexto profissional que lhe foi apresentado.

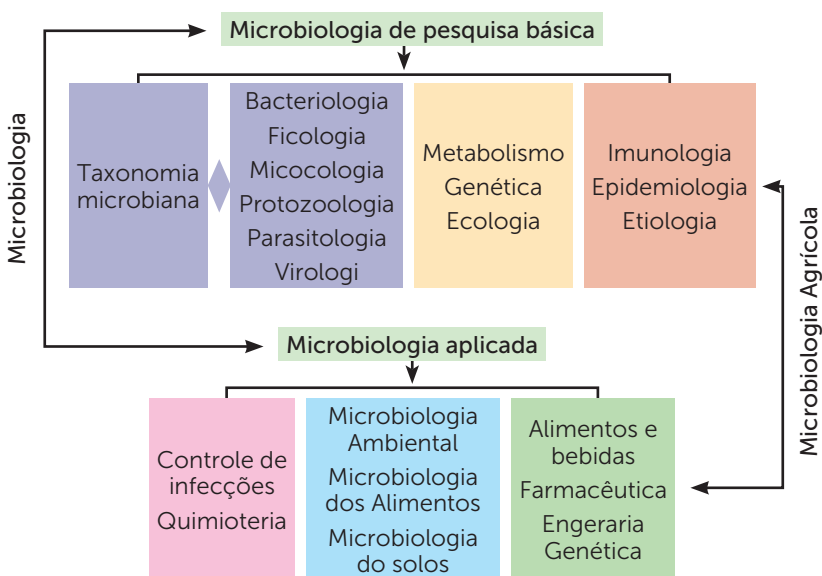
Mãos à obra!

Não pode faltar

Já sabemos que a microbiologia é o estudo dos microrganismos e que esses seres podem proporcionar diferentes efeitos ao meio ambiente e aos outros organismos aos quais convivem no ecossistema, não é mesmo?

Os pesquisadores da área microbiológica podem focar seus estudos nesses efeitos, interessando-se pela ecologia desses seres no ecossistema, pelos impactos negativos que eles podem causar, ou ainda pelos efeitos positivos que eles podem trazer às nossas vidas e às nossas atividades humanas, por exemplo. Essas diferentes áreas de interesse levaram à ramificação da microbiologia em campos de estudo que vão desde a microbiologia básica à microbiologia aplicada, conforme você pode ver com mais detalhes na Figura 1.5.

Figura 1.5 | Campos da microbiologia



Fonte: adaptada de Black (2016, p. 6).

Você percebeu que a microbiologia agrícola não se trata de um campo específico e limitado dentro da microbiologia? Isso acontece pois podemos entendê-la como uma área multidisciplinar que busca estudar desde a taxonomia microbiana aos processos

microbiológicos industriais dentro dos interesses das ciências agrárias, conforme exemplifica a Figura 1.5.

Assim, a microbiologia agrícola gera conhecimentos básicos e aplicados como a compreensão de microrganismos importantes a animais e vegetais; a melhoria de produtos, processos e serviços agropecuários e agroindustriais; o monitoramento da qualidade e da segurança alimentar de produtos disponibilizados à sociedade, além do equilíbrio ambiental.

Visando uma maior aplicabilidade às suas possíveis áreas de atuação profissional, abordaremos nessa seção a microbiologia do solo, dos alimentos, ambiental e industrial. Vamos começar?

Os estudos relacionados aos microrganismos do solo apresentam uma importância cada dia maior, uma vez que esse recurso natural é considerado o principal reservatório de diversidade biológica da natureza (CARDOSO & ANDREOTE, 2016). Essa diversidade depende de fatores abióticos, que já foram brevemente mencionados na Seção 1.1, como a atmosfera do solo, seu pH e a quantidade de água disponível, por exemplo, e é composta pela chamada fauna do solo, sendo:

- Macrofauna - invertebrados com mais de 10 mm de comprimento.
- Mesofauna - invertebrados menores.
- Microfauna - organismos microscópicos e de nosso interesse nessa disciplina.

Os microrganismos do solo apresentam numerosas funções em virtude da diversidade metabólica dos diferentes grupos. Segundo Cardoso & Andreote (2016), essa diversidade está relacionada à variabilidade genética de tais organismos, uma vez que sua origem e evolução os tornaram principais componentes do metabolismo do sistema solo. Isso significa que a microbiota presente no solo é responsável em grande parte pela qualidade dos nutrientes ali encontrados, pois são peças fundamentais nos ciclos biogeoquímicos estudados na seção anterior, você se lembra?



Metabolismo do solo: chamamos de metabolismo o conjunto de reações químicas que permitem que os microrganismos convertam a energia vinda da absorção dos nutrientes do solo em substâncias energéticas que irão possibilitar sua sobrevivência, crescimento e multiplicação. O metabolismo do solo se refere ao conjunto das transformações biocatalisadas que nele ocorrem (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Nesse sentido, as características dos microrganismos do solo proporcionam benefícios a esse recurso natural e aos ecossistemas, influenciando diretamente no desenvolvimento das plantas. A área de estudo da microbiologia do solo nos ajuda a acessar e a entender com maior profundidade a complexidade biológica desse sistema, visando o aumento da produtividade agrícola e conservação do meio ambiente.

Apesar da importância e dos esforços nos estudos, de acordo com Cardoso & Andreote (2016), nosso conhecimento em relação à microbiota dos principais biomas brasileiros ainda é pequeno, principalmente em virtude da dificuldade de amostragem de solo em relação à extensão do nosso território nacional. Se fôssemos analisar apenas o solo agrícola, presente de maneira pulverizada ao longo do país, precisaríamos amostrar cerca de 70 milhões de ha, correspondentes a aproximadamente 8,2% do território nacional (CARDOSO & ANDREOTE, 2016).

Assim, de maneira geral, a microbiologia agrícola, por meio dos conhecimentos de microbiologia do solo, busca avaliar o efeito do uso do solo sobre os microrganismos, bem como a utilização dos mesmos para a melhoria da produtividade agrícola. Isso é possível pois a microbiologia do solo estuda, entre outros fatores, os **serviços ecossistêmicos** prestados por grande parte dos microrganismos presentes nesse sistema, favorecendo os sistemas agrícolas e naturais.



Exemplificando

Além de realizar a ciclagem dos nutrientes por meio dos ciclos biogeoquímicos, que estudamos anteriormente, alguns microrganismos do solo possuem a capacidade de metabolizar compostos químicos e de utilizá-los como fonte de carbono e energia para sua sobrevivência e desenvolvimento. Isso significa que, em condições de campo, a interação desses microrganismos desempenha uma importante função na degradação de muitos resíduos de agrotóxicos, diminuindo seu poder residual no solo.



Vocabulário

Serviços ecossistêmicos: também chamado de serviços ambientais, esse é um termo muito utilizado na ecologia para se denominar os benefícios obtidos, direta ou indiretamente, da natureza, por meio dos ecossistemas.

Outra área que é de grande importância agrícola trata-se da microbiologia dos alimentos. Ela estuda os microrganismos importantes à conservação e qualidade dos alimentos bem como sua produção, uma vez que esses seres podem interferir tanto na vida útil dos alimentos que iremos consumir quanto atuar na produção de novos produtos alimentícios, ou ainda podem ser o próprio alimento.

Na seção anterior, você estudou que um dos efeitos que os microrganismos podem causar é a contaminação dos alimentos, degradando-os, ou ainda favorecendo a entrada de outros microrganismos patogênicos que podem nos causar mal à saúde, não é mesmo?

De acordo com Black (2016), milhões de pessoas no mundo todo são acometidas por casos de intoxicação alimentar por *Salmonella*, por exemplo, devido à manipulação inadequada de carne de frango, ovos e carne de porco ou vaca, motivo pelo qual existe a importante e constante preocupação com a qualidade dos produtos animais e vegetais.

Além disso, a área agrícola também pode utilizar os conhecimentos da microbiologia dos alimentos para aplicação na agroindústria. O

primeiro passo para a produção de queijos, por exemplo, é a adição de bactérias do ácido lático e enzimas (que podem ser provenientes do estômago das vacas ou bacterianas). Os queijos duros são curados pela ação também de microrganismos em ambiente frio e úmido (BLACK, 2016).

Outros exemplos de utilização de microrganismos na agroindústria são a produção de bebidas fermentadas como cerveja, vinho e outras bebidas alcóolicas e a produção do vinagre, do chucrute, das azeitonas em conserva, do molho de soja, dentre outros. Todos esses processos utilizam, em algum momento, dos efeitos dos microrganismos.



Refleta

Como os microrganismos conseguem realizar a transformação dos alimentos, sendo responsáveis pela produção de cervejas, vinhos, uísque, cachaça e até mesmo do combustível etanol? Qual é o ponto comum entre esses produtos?

Os processos fermentativos merecem destaque, pois são exemplos muito importantes na produção agroindustrial. Dentre os três principais tipos de fermentação utilizada pelas indústrias podemos citar a fermentação acética (responsável pela produção do vinagre, por exemplo), a fermentação alcoólica (responsável pela produção de bebidas alcóolicas como cervejas e vinhos, por exemplo) e a fermentação láctica (responsável pela produção de iogurtes e queijos).

De acordo com Damaso e Couri (2018), um processo fermentativo pode, em geral, ser resumido em quatro etapas principais, sendo:

- 1) Preparo do meio da fermentação: variável em relação ao produto final que se deseja.
- 2) Fermentação: etapa na qual os microrganismos transformam a matéria-prima em produto. O tipo de microrganismo também dependerá do produto final que se deseja.
- 3) Tratamentos finais: conjunto de processos para obtenção do produto com qualidade e pureza.
- 4) Tratamento dos resíduos gerados.

Nas indústrias de produção de bebidas alcóolicas e nas indústrias

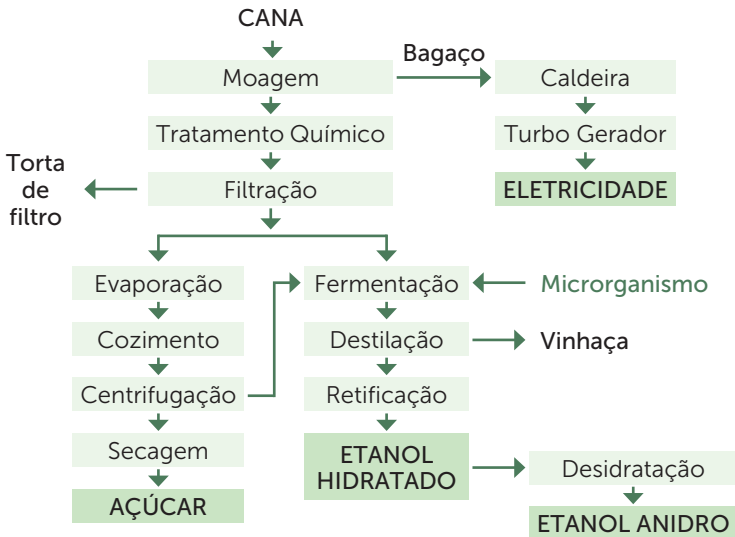
do setor sucroenergético, por exemplo, as leveduras são os microrganismos responsáveis pela obtenção do álcool, em virtude da fermentação. Ainda sobre as leveduras relacionadas aos processos fermentativos, segundo Pacheco (2010), existem relatos de utilização do gênero *Saccharomyces* como agente de transformação nesses processos desde o ano de 1800. Esse é um dos gêneros mais estudados devido ao interesse na indústria de biotecnologia (PACHECO, 2010).

Elas realizam a fermentação do açúcar do meio em que estão para adquirir a energia necessária à sua sobrevivência. O resultado é a utilização do subproduto desse processo. Sendo assim, para se produzir quaisquer bebidas alcoólicas, bem como o etanol (que é o álcool em sua versão utilizada como combustível) é necessário conhecer as condições ideais para as leveduras e o tipo de açúcar que será oferecido a ela, de acordo com o subproduto desejável. Na produção da cerveja, por exemplo, grãos de cereais são a fonte de açúcar para a fermentação. No caso do vinho é a uva e no caso da cachaça e do etanol no Brasil é a cana-de-açúcar (em alguns países, como nos Estados Unidos, por exemplo, é o milho).

Para que sejam economicamente viáveis, os processos fermentativos necessitam de cuidados específicos em cada etapa de produção, uma vez que as condições do meio sofrem influências de todas as etapas antecedentes (VANZELLA, 2014). Por exemplo, na produção do etanol, desde a produção e colheita da cana até a formação do mosto (que é a solução de açúcar ajustada para a fermentação), precauções devem ser tomadas a fim de se evitar contaminações externas que desfavoreçam as leveduras, resultando em conversões fora dos padrões de qualidade.

Você conhece as etapas de produção de uma indústria do setor sucroenergético? Veja na Figura 1.6 que o processo fermentativo e os microrganismos (leveduras) participam apenas da produção do etanol, não havendo necessidade de fermentação para a produção de açúcar e da eletricidade.

Figura 1.6 | Esquema de produção de açúcar, etanol e eletricidade



Fonte: adaptada de Vanzela et al. (2014. p. 53).



Assimile

Um dos problemas que pode ocorrer em um processo fermentativo de produção de etanol é a contaminação do mosto por microrganismos decorrentes do ataque da broca da cana *Diatraea saccharalis*. De acordo com Dinardo-Miranda et al. (2012), por meio dos orifícios feitos pelas lagartas, pode ocorrer a entrada de diversos microrganismos, como fungos, que causam a redução do teor de açúcar nos colmos, além da contaminação do caldo, que inibe a fermentação e prejudica os processos industriais.

Reparou como acabamos de transitar facilmente entre a microbiologia alimentar e a microbiologia industrial?

A microbiologia industrial é a área que estuda a utilização dos microrganismos nos processos industriais com a finalidade de produção de bens e serviços, sejam eles de interesse comercial, ambiental ou social.

Podemos citar como exemplos a produção de fármacos, vacinas, alimentos, bebidas, combustíveis e polímeros. Inevitavelmente, a área agrícola, além de realizar a produção de alimentos, ainda os

transforma por meio da agroindústria, motivo pelo qual tanto a microbiologia alimentar quanto a industrial transitarão facilmente pelo seu cotidiano profissional.

Por fim, e não menos importante, a microbiologia ambiental irá se dedicar ao estudo da fisiologia, da genética e das interações dos microrganismos com seu ambiente, objetivando a manutenção da qualidade ambiental, além de contribuir para o desenvolvimento sustentável das atividades agrícolas e da sociedade.

A microbiologia ambiental não é uma ciência nova, mas hoje, mais do que nunca, vem sendo requisitada no cenário mundial por estar envolvida em temas de grande importância como biorremediação, biocombustíveis, controle biológico de pragas, entre outros. Entretanto, de acordo com Melo e Azevedo (2008), no Brasil a microbiologia ambiental ainda se encontra em fase de expansão, necessitando de uma maior interação entre pesquisadores das áreas de genética, ecologia, química e biotecnologia, visando a resolução de problemas de qualidade ambiental dos ecossistemas, tão recorrentes nos dias hoje.

Assim, além de consolidada nas pesquisas relacionadas à ecologia e sustentabilidade, a microbiologia ambiental hoje vem abrangendo estudos também aplicados à saúde humana, de plantas e de animais, integrando-se às demais áreas da microbiologia.



Pesquise mais

Quer conhecer mais sobre a microbiologia ambiental e suas aplicações? A EMBRAPA Meio Ambiente disponibiliza livremente uma importante publicação que engloba inúmeras aplicações da microbiologia ambiental aos solos e biotecnologia.

O livro é extenso e muito completo, por isso não se preocupe com o volume do material. A indicação é para que você conheça a infinidade de possibilidades e áreas de estudo dentro da Microbiologia Ambiental.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Microbiologia Ambiental**. 2. ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008. 647p. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/149954/1/2008OL-05.pdf>>. Acesso em: 25 mar. 2018.

Assim, concluímos o estudo da nossa primeira unidade de ensino dessa disciplina de microbiologia agrícola. Agora, conhecendo os principais conceitos, os efeitos positivos e negativos que os microrganismos podem causar e as diferentes subáreas de estudo incluídas em nosso cotidiano profissional, nas próximas unidades continuaremos com o aprofundamento na biologia dos microrganismos, nos processos microbianos e nas técnicas aplicadas. Vamos em frente!

Sem medo de errar

Essa seção lhe possibilitou entender que a microbiologia agrícola não se trata de uma área isolada de estudo, permeando diferentes subáreas de maneira horizontal, sempre buscando as melhores práticas e estudos dentro da sua atuação nas ciências agrárias, não é mesmo?

Nesse sentido, você vem atuando como um dos engenheiros agrônomos de uma usina sucroalcooleira, sendo o gestor responsável pelo levantamento e controle de pragas e doenças da cana-de-açúcar. Em seu último desafio, o gerente da área industrial da usina procurou você a fim de reportar um problema na produção do etanol. Ele afirmou que a área agrícola é muito importante para o sucesso do processo fermentativo da usina, pois a contaminação microbiana vinda da produção agrícola ocasiona perdas significativas na atividade industrial. Quais seriam esses microrganismos fermentadores atuantes na produção do etanol? E como a área agrícola poderia ser tão importante para o sucesso da fermentação industrial? Quais seriam outros exemplos de indústrias onde os microrganismos poderiam ser importantes?

Tanto nas indústrias de produção de bebidas alcoólicas quanto nas indústrias do setor sucroenergético, por exemplo, as leveduras são os microrganismos responsáveis pela obtenção do álcool, em virtude da fermentação. O gênero mais estudado e utilizado desse microrganismo é o *Saccharomyces*, que vem sendo utilizado como agente de transformação nesses processos desde o ano de 1800.

Entretanto, para que os processos fermentativos sejam economicamente viáveis, eles necessitam de cuidados específicos em cada etapa de produção, e no caso do etanol, a área agrícola deve

manter o controle da cultura da cana que irá para a moagem na usina, evitando-se assim contaminações externas que desfavoreçam as leveduras, resultando em conversões fora dos padrões de qualidade. Essas contaminações são, em grande parte, decorrentes do ataque de microrganismos oportunistas, como fungos e bactérias, que se instalam no colmo da cana durante o ataque da *Diatraea saccharalis*, praga que você e sua equipe devem controlar.

Além da indústria alcooleira, pensando em outros exemplos de indústrias do setor agrícola que utilizam microrganismos, temos aquelas que produzem bebidas fermentadas como cerveja, vinho e outras bebidas alcóolicas, além da produção de vinagre, de chucrute, de azeitonas em conserva, de molho de soja, dentre outros. Todos esses processos utilizam, em algum momento, efeitos dos microrganismos.

Agora que você conseguiu esclarecer algumas dúvidas na usina em que trabalha, não deixe de consolidar todas as informações e elaborar um relatório sobre suas diferentes atividades realizadas. Analise os efeitos positivos e negativos que os microrganismos podem causar à cultura da cana e à produção sucroalcooleira de acordo com o que você estudou até aqui. Mãos à obra!

Avançando na prática

Um novo mercado

Descrição da situação-problema

Um mercado de cervejas artesanais vem ganhando cada dia mais espaço e clientes por todo o Brasil. A produção de cervejas é uma arte antiga, mas por muito tempo esse mercado foi dominado pelas grandes indústrias. De um tempo para cá, você, engenheiro agrônomo, vem se interessando pelo nicho de mercado das cervejas artesanais, pois, além de apreciador, agora pretende ingressar no universo dos mestres cervejeiros, plantando a sua própria cevada para a fabricação do malte e realização da fermentação. Seu futuro sócio, que não conhece nada sobre processos fermentativos e produção de bebidas alcóolicas, pede que você lhe explique o princípio dos processos fermentativos e da produção de cerveja. Como você explicaria a ele quais são as etapas principais de um

processo fermentativo? Qual seria o microrganismo indicado para a produção de cervejas?

Resolução da situação-problema

Você deve explicar ao seu futuro sócio que os processos fermentativos são muito importantes em diferentes tipos de produção agroindustrial, não somente de cervejas. De maneira geral, ele pode ser resumido em quatro etapas principais, sendo:

- 1) Preparo do meio da fermentação: que vai variar de acordo com o produto final que se deseja.
- 2) Fermentação: etapa na qual os microrganismos transformam a matéria-prima em produto.
- 3) Tratamentos finais: Conjunto de processos para obtenção do produto com qualidade e pureza.
- 4) Tratamento dos resíduos gerados.

Nas indústrias de produção de bebidas alcoólicas, como a indústria cervejeira, por exemplo, as leveduras são os microrganismos responsáveis pela fermentação e pelo teor alcoólico. Ainda sobre as leveduras relacionadas aos processos fermentativos, o gênero *Saccharomyces* é um dos gêneros mais utilizados.



Pesquise mais

Gostou do tema e quer saber mais sobre o mercado das cervejarias artesanais no Brasil? Você pode acessar o link abaixo e conhecer ideias de negócio e oportunidades de trabalho com elas. Para um agrônomo é possível transformar um hobby em uma profissão, tornando-se um mestre cervejeiro. Essa profissão é indicada para pessoas com afinidade por assuntos técnicos em química, botânica, microbiologia e gestão aplicada à indústria. Interessante, não?

Veja mais em:

MESTRE-CERVEJEIRO.COM. **Ideias de Negócio no Mercado de Cerveja Artesanal**. 16 nov. 2017. Disponível em: <<http://www.mestre-cervejeiro.com/ideias-de-negocio-mercado-de-cerveja-artesanal/>>. Acesso em: 27 mar. 2018.

Faça valer a pena

1. A microbiologia agrícola pode ser entendida como uma área multidisciplinar que busca conhecimentos tanto básicos quanto aplicados, estudando desde a taxonomia microbiana até os processos microbiológicos industriais dentro dos interesses das ciências agrárias.

Analise as subáreas da microbiologia a seguir:

- I. Microbiologia Industrial.
- II. Microbiologia Ambiental.
- III. Bacteriologia.
- IV. Microbiologia Alimentar.

Com base no texto-base, pode-se afirmar que são áreas de aplicação da microbiologia agrícola, apenas:

- a) I.
- b) I e II.
- c) I, II e III.
- d) I, II e IV.
- e) I, II, III e IV.

2. Além de realizar a ciclagem dos nutrientes por meio dos ciclos biogeoquímicos, alguns microrganismos do solo possuem capacidade de metabolizar compostos químicos e utilizá-los como fonte de carbono e energia para sua sobrevivência e desenvolvimento. Isso significa que, em condições de campo, a interação desses microrganismos desempenha uma importante função na degradação de muitos resíduos de agrotóxicos, diminuindo seu poder residual no solo.

Identifique a seguir a alternativa que corresponde à(s) área(s) da microbiologia responsáveis pelo processo microbiano citado no texto-base.

- a) Microbiologia Agrícola, apenas.
- b) Microbiologia do Solo e Microbiologia Industrial.
- c) Microbiologia Ambiental, apenas.
- d) Microbiologia do Solo e Microbiologia Ambiental.
- e) Microbiologia do Solo, apenas.

3. Analise as asserções a seguir e a relação proposta entre elas:

I. Na produção de bebidas alcoólicas, desde a produção agrícola até o processamento da bebida na agroindústria, precauções devem ser tomadas a fim de se evitar contaminações externas

PORQUE

II. as contaminações externas nas etapas antecedentes podem desfavorecer as leveduras, resultando em conversões fora dos padrões de qualidade e, conseqüentemente, na inviabilidade da produção.

Assinale a alternativa que apresenta a relação correta entre as asserções:

- a) As asserções I e II são corretas e a II justifica a I.
- b) As asserções I e II são corretas e a II não justifica a I.
- c) A asserção I é correta e a II é falsa.
- d) A asserção I é falsa e a II é correta.
- e) As asserções I e II são falsas.

Referências

- ALVES, S. B. (ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. 2. Ed. Piracicaba: FEALQ, 1998.
- AVILA-CAMPOS, Mario Júlio. **Introdução à Microbiologia**. Arquivos de aulas. Universidade de São Paulo, 2016. Disponível em: <http://www.icb.usp.br/bmm/mariojac/arquivos/Aulas/Introducao_Microbiologia_Texto.pdf>. Acesso em: 4 mar. 2018.
- BATISTA FILHO, A. et al. Retrospectiva do controle microbiano de pragas agrícolas no Brasil. **Páginas do Inst. Biol.**, São Paulo, v. 9, n. 1, p. 31-33, jan./jun. 2013. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/pag/v9_1/batista.pdf>. Acesso em: 14 mar. 2018.
- BLACK, J. G. **Microbiologia: Fundamentos e perspectivas**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.
- CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do Solo**. 2. ed. Piracicaba: ESALQ, 2016.
- DAMASO, M. C. T.; COURI, S. Fermentação. **Agência Embrapa de Informação Tecnológica**. Brasília: EMBRAPA, [s.d.]. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CONT000fid5sgif02wyiv80z4s4737dnfr3b.html>. Acesso em: 22 mar. 2018.
- DINARDO-MIRANDA, L. L. et al. Influência da infestação de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) sobre parâmetros tecnológicos da cana-de-açúcar. **Bragantia**, Campinas, v. 71, n. 3, p. 342-345, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/brag/v71n3/aop_1390_12.pdf>. Acesso em: 25 mar. 2018.
- EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Laboratório de Microbiologia Agrícola**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/arroz-e-feijao/infraestrutura/microbiologia-agricola>>. Acesso em: 25 fev. 2018.
- MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Microbiologia Ambiental**. 2. ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008. 647 p. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/15285/microbiologia-ambiental>>. Acesso em: 25 mar. 2018.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. Disponível em: <<http://www.prpg.ufla.br/solos/wp-content/uploads/2012/09/MoreiraSiqueira2006.pdf>>. Acesso em: 5 mai. 2018.
- PACHECO, T. F. **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. 2010. 94 p. Dissertação (Mestre em Engenharia Química). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/15136/1/thalita.pdf>>. Acesso em: 22 mar. 2018.
- TRIGIANO, R. N.; WINDHAM, M. T.; WINDMAN, A. S. **Fitopatologia: Conceitos e**

Exercícios de Laboratório. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

VALICENTE, F. H. **Controle biológico de pragas com entomopatógenos**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 2009. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/574316/1/Controlebiologico.pdf>>. Acesso em: 14 mar. 2018.

VANZELLA, E. et al. Processo fermentativo na indústria sucroalcooleira. **Acta Iguazu**. Cascavel, v. 3, n. 1, p. 50-58, 2014. Disponível em: <<http://e-revista.unioeste.br/index.php/actaiguazu/article/viewFile/9627/7065>>. Acesso em: 22 mar. 2018.

VIEIRA, D. A. P.; FERNANDES, N. C. A. Q. **Microbiologia Geral**. Inhumas: Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia. 2012.

Características dos microrganismos de interesse agrícola

Convite ao estudo

Olá, aluno! Estamos iniciando mais uma unidade de ensino da disciplina de Microbiologia Agrícola. Agora que você já conhece os conceitos iniciais e áreas de estudo dentro da microbiologia, podemos dar sequência em nosso aprendizado nos aprofundando um pouco mais no universo dos microrganismos.

Nesta Unidade 2 você conhecerá e será capaz de identificar e analisar os principais aspectos relacionados aos microrganismos de importância agrícola, sendo eles: as bactérias, os fungos e os vírus. Nesse sentido, você será levado a um novo desafio profissional, agora como engenheiro agrônomo contratado por uma propriedade que há muitos anos realiza o cultivo de cítricos.

A propriedade em questão, familiar e atuante na produção citrícola há mais de 40 anos, divide sua produção entre laranja, lima ácida e tangerina. Até o ano passado as frutas eram direcionadas exclusivamente para a indústria, entretanto, buscando fugir dos baixos preços praticados por esse setor, resolveu diversificar sua cartela de clientes, escoando sua produtividade também para supermercados, feirantes e restaurantes.

A mudança de foco da indústria para a fruta de mesa obrigou os produtores a investirem também na qualidade de seus produtos, principalmente em relação à aparência. Sendo assim, o agricultor contratou você, engenheiro agrônomo especialista em microbiologia, para cuidar das doenças do pomar, evitando

a diminuição da produtividade bem como a manutenção da aparência sadia dos frutos que vão para a mesa.

Este será seu desafio nesse novo trabalho, levantar os tipos de microrganismos existentes na propriedade de citros e também os tipos de danos e benefícios que eles podem causar. Quais são eles? Como reconhecê-los? Quais sintomas de doenças eles podem causar nas plantas? E quais os benefícios?

Para lhe ajudar a responder questões como essas, iniciaremos agora o estudo das bactérias, fungos e vírus, em que conheceremos sua morfologia e seus aspectos biológicos, como crescimento e reprodução, além das características de cada tipo de sintoma que eles podem causar. Pronto para começar? Vamos lá!

Seção 2.1

As bactérias e sua interferência na produção agrícola

Diálogo aberto

Conhecer um determinado microrganismo e analisar suas características tanto morfológicas quanto biológicas são importantes aspectos para que seja possível diferenciá-los, classificá-los e ainda para cultivá-los em laboratório ou impedir que eles se desenvolvam de maneira indesejável nas plantas, em especial nas culturas agrícolas.

Assim, nessa primeira seção, iniciamos nossos estudos sobre os principais microrganismos de interesse agrícola com as bactérias, importantes tanto por seu potencial patogênico no campo quanto pelo benefício que elas podem causar às lavouras, por meio de seu efeito também no controle de pragas.

Para isso, você deve retomar seu papel como engenheiro agrônomo da propriedade de citros, que será sua nova atuação profissional a partir de agora. Em seu primeiro dia de trabalho na fazenda, ainda quando conhecia os talhões, um funcionário perguntou se você era o novo agrônomo e se podia auxiliá-lo com o controle de uma praga que estava causando danos aos frutos de uma planta. Apesar dos insetos não serem exatamente sua área de atuação, você se prontificou a ajudar e se deslocou até a linha indicada pelo funcionário.

Chegando lá, você se depara com uma planta apresentando os seguintes sintomas: presença de ramos com folhas amareladas, brotos novos com folhas pequenas, amarelas e voltadas para cima de maneira anormal e frutos deformados, apresentando uma coloração verde clara, com aspecto manchado. Ao cortar os frutos você percebeu filetes alaranjados, sementes necrosadas e com espessura da casca maior que a dos frutos saudáveis. Além de analisar os sintomas, você procura por sinais de ataque de insetos e também desconfia ao verificar que, aparentemente, apenas esta planta apresenta tais características, descartando a possibilidade de ataque de pragas, que se dispersam rapidamente, bem como os sinais de seu ataque.

Então você agradece a observação do funcionário e explica a ele que os sintomas não foram causados diretamente pelo ataque de insetos, mas que se trata de uma doença chamada popularmente de *greening* (Huanglongbing/HLB). Essa doença é causada por bactéria e transmitida para as plantas de citros por um inseto chamado *Diaphorina citri*. O funcionário, interessado em conhecer um pouco mais sobre as bactérias e como elas podem causar doenças em plantas, o questionou: as bactérias que prejudicam as plantas são as mesmas que causam doenças nos seres humanos? A bactéria infectou a planta pelo ataque do inseto, mas como ela se reproduziu na planta? E quais seriam outros possíveis sintomas que uma planta infectada por bactérias poderia ter?

Além de responder ao funcionário, você se vê frente a sua primeira tarefa: relatar esses sintomas e sua desconfiança sobre o possível tipo de agente causal para que o produtor possa tomar as devidas providências e enviar o material coletado para análise em laboratório, a fim de se identificar com certeza o agente causal.

Para responder essas questões ao funcionário da fazenda, nesta seção você irá entender os aspectos morfológicos e biológicos relacionados às bactérias, compreendendo melhor sua classificação, como se desenvolvem, se reproduzem e se disseminam. Além disso, você conhecerá os tipos de sintomas que as bactérias fitopatogênicas podem causar às plantas e também os benefícios que outras podem proporcionar às culturas. Mãos à obra!

Não pode faltar

As bactérias, foco de nosso estudo nesta primeira seção da Unidade 2, são seres relativamente simples quando se trata de sua morfologia. Elas são formadas por uma única célula procarionte, por isso, podemos considerá-las simples, entretanto, podemos dizer também que possuem um metabolismo complexo e versátil, possibilitando uma nutrição de maneira heterotrófica ou autotrófica e que sobrevivam em diferentes habitats.



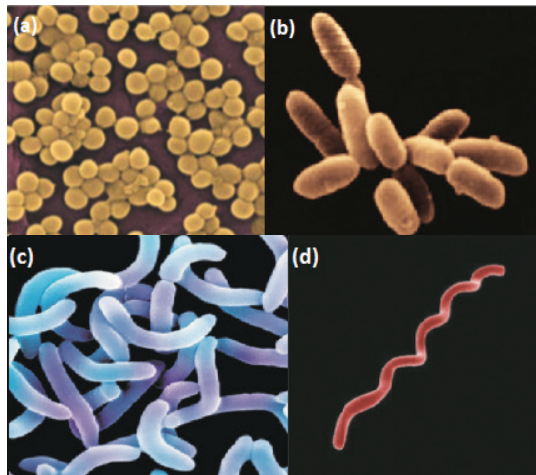
Seres heterótrofos: são aqueles que não possuem a capacidade de fabricar seu próprio alimento, necessitando se alimentar de outros seres.

Seres autótrofos: são seres que possuem a capacidade de produzir seu próprio alimento, seja por quimiossíntese (utilização de matérias inorgânicas, gás carbônico e água para produção de matéria orgânica) ou por fotossíntese (transformação de energia luminosa em química).

Para se ter uma noção do tamanho das bactérias típicas, é importante saber que elas são medidas em micrômetros (μm), sendo que as em forma de bastonete podem variar de 2 a 6 μm de comprimento e 1 a 2 μm de largura, e uma bactéria em formato esférico pode ter por volta de 1 μm de diâmetro. O tamanho pode ser tão variável em função das diferentes formas que as bactérias podem apresentar. Vamos conhecer quais são?

As bactérias podem se apresentar basicamente de forma esférica (coco), em forma cilíndrica (bastonete ou bacilo), em forma cilíndrica curva (vibrião), e de maneira espiral (espirilo e espiroqueta). Essas são as formas mais comuns, apresentadas na figura 2.1.

Figura 2.1 | Principais formas bacterianas: (a) Cocos; (b) Bacilos; (c) Vibriões; (d) Espirilos



Fonte: adaptada de Vieira; Fernandes (2012).

As formas esféricas, chamadas cocos, são aquelas que se apresentam de maneira mais homogênea em relação ao tamanho das células. Dependendo de como se organizam, eles levam diferentes denominações. A essas diferentes formas de se organizar, chamamos de arranjos, como: **diplococos**, se apresentam aos pares; **estreptococos**, se apresentam em forma de cadeia; **tétrades**, se apresentam em grupos de quatro, **sarcinas**, se agrupam em oito cocos em forma cúbica; e **estafilococos**, se apresentam formando cachos.

Já as formas cilíndricas, chamadas bacilos, apresentam grande variação na forma e no tamanho, dependendo do gênero e espécie da bactéria. Elas também podem se apresentar em arranjos, mas não necessariamente na mesma disposição dos cocos. Os bacilos podem se apresentar isolados, em forma de **diplobacilos**, **estreptobacilos** ou ainda, em alguns casos, podem não constituir padrões morfológicos característicos, devido às diferentes etapas de crescimento ou às condições ambientais ou de cultivo em laboratório.



Assimile

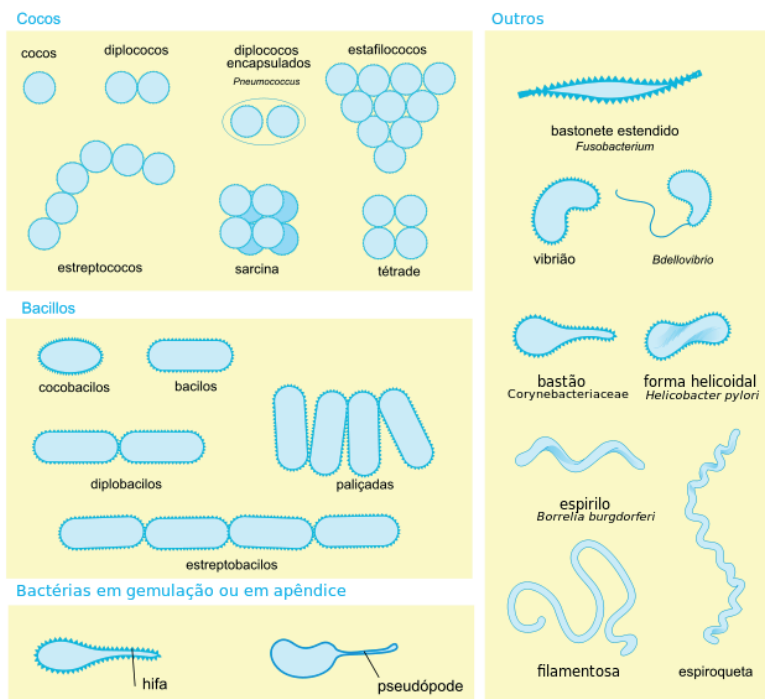
De maneira geral, os cocos e os bacilos são formas de bactérias mais comuns e, geralmente, as formas que mais contaminam os processos fermentativos nas indústrias de açúcar e de álcool – que vimos na seção anterior.

Há ainda as formas espiraladas, que se dividem em espirilos e espiroquetas. Os espirilos são bactérias que possuem corpo rígido e se movem por meio de flagelos externos. Já as espiroquetas são bactérias que possuem o corpo flexível e se movem por contrações do seu citoplasma, não possuindo flagelos externos.

Além desses três tipos de formas, as bactérias ainda podem apresentar uma morfologia de transição, sendo bacilos muito curtos, chamados de **cocobacilos**, ou ainda bacilos curvos, chamados de **vibrião**.

Vejam na Figura 2.2 os diferentes aspectos e arranjos morfológicos dos quais podem se apresentar as bactérias:

Figura 2.2 | Morfologia e arranjos bacterianos

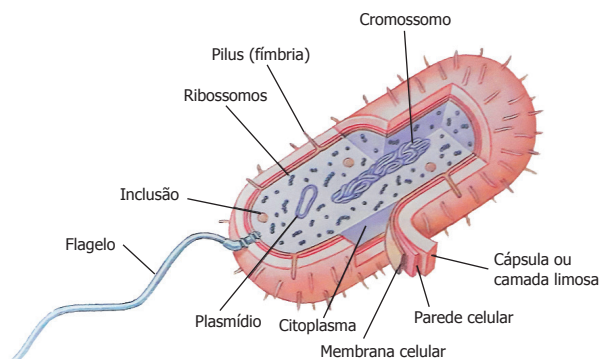


Fonte: <<https://goo.gl/Veitjp>>. Acesso em: 4 abr. 2018.

A aparência externa de um microrganismo, também chamada de morfologia, constitui seu tamanho, sua forma e seu arranjo, conforme estudamos até aqui para as bactérias. Entretanto, ainda precisamos conhecer um pouco mais sobre a estrutura desses seres, dando-lhe uma visão geral.

Estruturalmente, as células bacterianas se constituem de parede celular, membrana celular, citoplasma com ribossomos, região nuclear e em alguns casos, grânulos e/ou vesículas. Além disso, externamente, as bactérias podem possuir estruturas como cápsulas, flagelos e *pili* (fímbrias) (BLACK, 2016). Veja na Figura 2.3 uma célula bacteriana típica, com todas as possíveis estruturas representadas:

Figura 2.3 | Célula bacteriana típica (a célula representada é um bacilo flagelado)



Fonte: Black (2016, p. 73).

A parede celular é uma estrutura semirrígida presente em quase todas as bactérias. Para elas essa estrutura é importante, pois impede que a célula estoure em casos de turgor, além de atuar como uma barreira de proteção contra possíveis agentes químicos e físicos externos. Para nós, a parede celular é uma estrutura importante, pois nos permite diferenciar espécies de bactérias de acordo com sua reação às colorações.

De acordo com a composição de sua parede celular, as bactérias podem ser divididas em Gram-positivas e Gram-negativas. A coloração de Gram é muito importante quando estudamos bactérias, pois permite identificá-las e classificá-las.

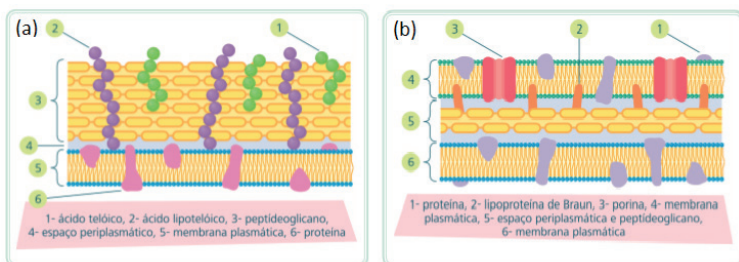
! Atenção

Nesta seção você conhecerá os princípios dessa técnica, voltados para a morfologia bacteriana, e na Unidade 4 conhecerá o passo a passo para realizá-la em laboratório!

O que acontece é que a parede celular de bactérias Gram-positivas possui basicamente peptidoglicano em uma camada espessa ao redor da célula. Já nas bactérias Gram-negativas este peptidoglicano é uma camada delgada e representa cerca de 10 a 20% da composição da parede celular. Neste caso, há ainda uma membrana externa composta por vários polissacarídeos, proteínas e lipídeos. Veja a diferença entre elas na figura 2.4. Note que a

camada de peptideoglicano é maior nas bactérias Gram-positivas (a), que possuem uma única membrana plasmática. Enquanto isso, as bactérias Gram-negativas (b) possuem uma camada mais fina de peptideoglicano, envolta por duas camadas de membrana plasmática.

Figura 2.4 | Parede celular de bactéria (a) Gram-positiva (b) Gram-negativa



Fonte: Vieira; Fernandes (2012, p. 43).

Em virtude dessa diferença estrutural, durante o processo de coloração, o cristal violeta e o lugol irão penetrar em ambos os tipos de bactérias, fazendo com que os dois tipos apresentem a cor roxa. Entretanto, após aplicar o álcool em ambas os casos, nas Gram-positivas, o álcool não irá retirar a coloração, em virtude da espessa camada de peptideoglicano, que retém o corante. Em contrapartida, nas Gram-negativas, devido à fina espessura da camada de peptideoglicano, o corante é extraído pelo álcool, descolorindo as células e tornando-as avermelhadas. Assim, as bactérias Gram-positivas ficarão coradas em roxo, enquanto as Gram-negativas ficarão coradas em vermelho (BLACK, 2016).



Pesquise mais

Gostaria de relembrar ou conhecer um pouco mais sobre a estrutura e os componentes das células procariontes?

A Universidade de São Paulo (USP) disponibiliza livremente uma plataforma interativa onde você pode conhecer cada uma das estruturas da célula. Ative o som e clique em cada uma das estruturas para ouvir uma breve explicação.

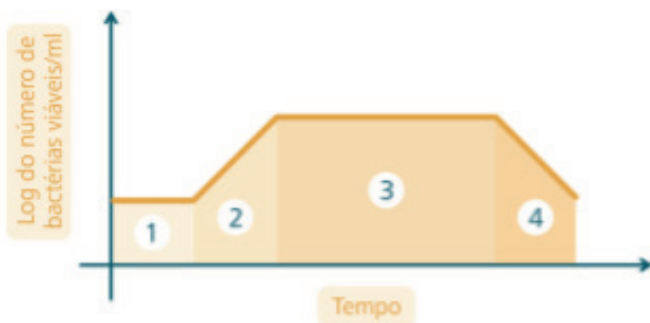
Disponível em: <<http://cbme.usp.br/playercbme/celulasvirtuais/know/procariota.html>>. Acesso em: 10 abr. 2018.

Agora que você já conhece a morfologia e os possíveis arranjos das bactérias, precisamos avançar, conhecendo como elas crescem e se reproduzem. Sim, esses termos parecem significar a mesma coisa, entretanto possuem conceitos distintos. Vamos entender cada um deles?

Chamamos de crescimento bacteriano a soma dos processos metabólicos das bactérias que levarão à sua reprodução. Sendo assim, podemos entender que o crescimento é exponencial referindo-se ao aumento do número de células e não ao aumento do tamanho celular, que é o que geralmente imaginamos pela palavra "crescimento".

Considerando uma população de organismos em meio rico em nutrientes e em condições ambientais favoráveis, o crescimento bacteriano se comportará em 4 etapas bem definidas, formando uma curva de crescimento padrão. A primeira é a fase de espera, também chamada de fase *lag*, sem divisão celular (Figura 2.5 - 1). Em seguida ocorre a fase de crescimento exponencial, também chamada de fase *log*, em que as bactérias vão aumentar sua quantidade em velocidade logarítmica (Figura 2.5 - 2). Na fase estacionária, o número de mortes se iguala ao número de células produzidas (Figura 2.5 - 3) e finalmente, na fase de declínio, as bactérias passam a morrer mais do que se reproduzir (Figura 2.5 - 4) (BLACK, 2016).

Figura 2.5 | Curva padrão de crescimento bacteriano e suas fases



Fonte: adaptada de Vieira; Fernandes (2012).

Mas afinal, como as bactérias se reproduzem, aumentando a sua quantidade de indivíduos?

Geralmente elas realizam reprodução assexuada, dividindo-se por meio de divisão binária, também chamada cissiparidade, ou por brotamento. No primeiro processo, a célula duplica seus componentes, dividindo-se em duas. Já no segundo processo, uma pequena célula se desenvolve a partir da superfície de outra célula preexistente, separando-se da mãe.



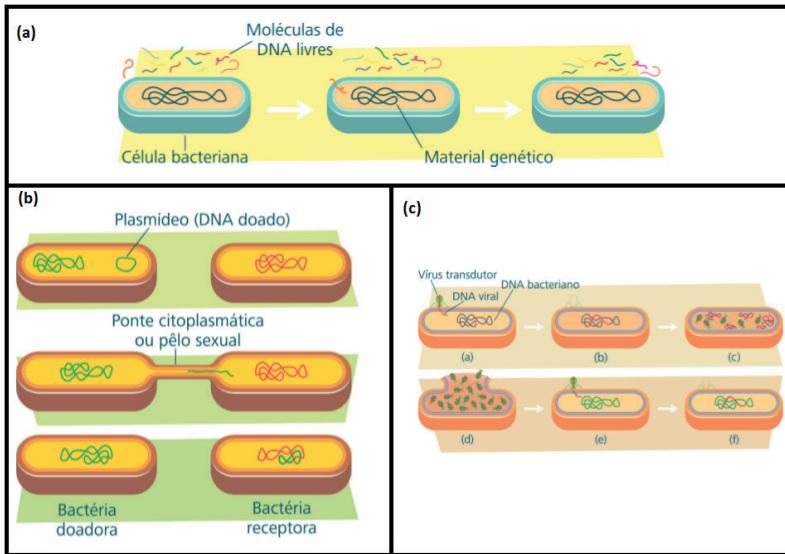
Assimile

Em algumas espécies de bactérias, durante o processo de divisão binária, ocorre a separação incompleta dos indivíduos, produzindo os arranjos estudados anteriormente. Por exemplo: cadeias lineares de bacilos, tétrades ou sarcinas.

Embora a reprodução bacteriana não seja sexuada, pode haver troca de material genético entre duas células diferentes. A esses casos, chamamos de recombinação genética, que pode ocorrer por processos de transformação, conjugação ou transdução.

A **transformação** (Figura 2.6 – a) trata-se da simples incorporação de moléculas livres de DNA, de outra bactéria que tenha se rompido, por exemplo. Já a **conjugação** (Figura 2.6 – b) ocorre quando duas bactérias, geneticamente diferentes, realizam troca de DNA por meio do *pili*. Por fim, na **transdução** (Figura 2.6 – c) a troca de material genético ocorre pela transferência do DNA por meio de um vírus bacteriófago. Neste caso, o DNA do vírus mistura-se com o DNA bacteriano, e ele passa a ser portador desse DNA, podendo repassar a uma segunda bactéria que venha a infectar. Outro mecanismo também importante para que as bactérias adquiram novas informações genéticas é por meio da conversão lisogênica, que estudaremos de maneira mais detalhada na Seção 2.3, quando estudarmos os vírus.

Figura 2.6 | Recombinação genética em bactérias. (a) Transformação; (b) Transdução; (c) Conjugação



Fonte: adaptada de Vieira; Fernandes (2012).

É importante ressaltar ainda que, durante a replicação do seu material genético, as bactérias podem sofrer mutações. Em ambos os processos, tanto na recombinação genética quanto na mutação há ganho ou mistura de genes, permitindo a formação de bactérias com novas características.



Refleta

Se uma bactéria sofre recombinação gênica ou mutação em algum momento da sua vida, ela poderá passar essas novas informações genéticas para as suas células filhas?

Na Unidade 1, estudamos alguns efeitos que os microrganismos podem causar aos seres vivos, aos ecossistemas e também a nós, seres humanos, não é mesmo? Você conheceu alguns deles e viu que esses efeitos podem ser tanto negativos quanto positivos, causando-nos prejuízos ou favorecendo a nossa vida e nossas atividades de alguma maneira.

Uma informação importante em relação a isso é que as bactérias, assim como os demais organismos, possuem certa especificidade em relação a sua vida e os efeitos que podem causar, variando de espécie para espécie. As bactérias fitopatogênicas, por exemplo, possuem uma característica única de colonizar tecidos das plantas, sendo essa sua essência: a habilidade de viver e multiplicar-se nos tecidos das plantas (TRIGIANO et al. 2010). Nesse sentido, uma bactéria fitopatogênica não causará doença em animais e seres humanos.

De acordo com Almeida (2006), podemos elencar alguns tipos de sintomas comuns quando tratamos de doenças relacionadas a bactérias fitopatogênicas. De maneira geral, podemos agrupá-las em: manchas e necroses; hiperplasia e hipertrofia; podridão mole e murcha (Figura 2.7).

Figura 2.7 | Diferentes sintomas de doenças bacterianas em tomateiro. (a) Manchas; (b) Podridão mole; (c) murcha



Fonte: adaptada de <<https://goo.gl/aPtWtv>>. Acesso em: 11 abr. 2018.

Saiba mais

Chamamos de **sintomatologia** a área da Fitopatologia que estuda os sinais e sintomas relacionados às doenças das plantas. Os sinais são as estruturas do patógeno exteriorizadas na planta doente, já os sintomas são as reações da planta ao patógeno.

As **manchas e necroses** são consideradas o tipo de sintoma mais comum, caracterizadas por lesões em folhas, nos ramos e nos frutos. Elas podem receber diferentes denominações de acordo com o local e gravidade em que ocorrem. Por exemplo, quando as lesões foliares são delimitadas pelas nervuras, chamamos de **mancha angular**. Já quando as lesões são necróticas e profundas, são chamadas de **cancros**. Já a **hiperplasia e hipertrofia** trata-se

da multiplicação celular exagerada ou o aumento do tamanho da célula vegetal, levando a um crescimento excessivo do órgão ou tecido afetado. Podem ocorrer, por exemplo, a proliferação anormal de raízes e brotos.

A **podridão mole** é resultado da produção de enzimas pela bactéria que degradam a parede celular das plantas infectadas. A **murcha**, por sua vez, irá ocorrer em virtude da obstrução dos vasos condutores pelas bactérias, impedindo ou dificultando o transporte de água e nutrientes. Além da murcha, essa infecção pode causar ainda nanismo e/ou clorose

É importante ressaltar que a identificação das bactérias fitopatogênicas não deve ser baseada apenas nos sintomas que a planta apresenta, uma vez que vírus, fungos, nematoides ou até mesmo desequilíbrios nutricionais podem causar sintomas semelhantes. Além disso, uma mesma bactéria pode causar mais de um tipo de sintoma na planta, fazendo-se necessária a realização de análises laboratoriais para a confirmação do agente causal (ALMEIDA, 2006). Um dos motivos pelos quais estudamos microbiologia agrícola.

Em contrapartida aos prejuízos econômicos que as bactérias fitopatogênicas podem trazer às culturas agrícolas, existem outras espécies que nos auxiliam a melhorar a produção, por exemplo, bactérias que estimulam o crescimento das plantas ou ainda realizam o controle de pragas de doenças.

Você se lembra que as bactérias podem fixar nitrogênio nas raízes das plantas? Por meio de pesquisas de microbiologia agrícola e biotecnologia, atualmente já é possível realizar a adição de bactérias fixadoras de nitrogênio às sementes de leguminosas, como soja e feijão, antes do plantio. Esse processo é chamado de inoculação e o produto é chamado de inoculante ou biofertilizante. Este é um produto inovador na agricultura brasileira, mas já é amplamente utilizado em outros países como o México e Argentina.

Além da função de fixar o nitrogênio nas raízes e participar da ciclagem de diferentes nutrientes, algumas bactérias possuem ainda a capacidade de solubilizar o fósforo presente no solo, disponibilizando-o para o vegetal, não é mesmo? Nesse caso também o uso das bactérias torna-se essencial e vantajoso para agricultores, consumidores e também para o meio ambiente, uma

vez que a maior parte dos solos brasileiros são pobres em fósforo. Com essa técnica, podemos hoje substituir o uso de fertilizantes de nitrogênio e fósforo, reduzindo os custos de produção, uma vez que o produto biológico é mais barato. Segundo a EMBRAPA (2016), os custos com fertilizantes para atender essa demanda correspondem a mais de 50% do custo da implantação final de uma lavoura.

Há ainda aquelas bactérias benéficas que proporcionam o controle biológico de pragas e doenças. O controle biológico por entomopatógenos, microrganismos que causam doenças a insetos, é uma alternativa de alta especificidade, diminuindo a possibilidade de resistência das pragas em relação aos defensivos e com baixo efeito residual no ambiente. Um exemplo é o *Bacillus thuringiensis*, mais conhecido como *bt*. Trata-se de uma bactéria isolada e desenvolvida com ajuda de pesquisa em microbiologia para o controle de lagartas em soja. Hoje, além da sua produção como bioinseticida, a biotecnologia já possibilitou a inserção de genes *bt* em plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos, como é o caso da soja *bt*.



Exemplificando

Um dos grandes desafios da agricultura orgânica é a produção de mudas de hortaliças de qualidade, sem a utilização de agrotóxicos e fertilizantes solúveis. Na busca por alternativas que possam ajudar nesses casos, as bactérias do gênero *pseudomonas* tornam-se uma importante aliada. Segundo estudo da EMBRAPA, já existe pelo menos uma estirpe para promoção do desenvolvimento de plantas e outra que inibe a ação de agentes causadores do tombamento das mudas (EMBRAPA, 2016).

No Brasil ainda não é comum esse tipo de produto bacteriano no mercado nacional, entretanto, segundo a EMBRAPA (2016), em outros países, como Estados Unidos, Canadá e Argentina, já podemos encontrar vários deles.

Sem medo de errar

Chegamos ao final de mais uma seção da nossa disciplina. Desta vez você conheceu um pouco mais sobre os seres procariontes, comumente

chamados de bactérias, sua morfologia, classificação, reprodução, crescimento, fitopatogenicidade e benefícios para a agricultura.

Lembre-se que em seu primeiro dia de trabalho na fazenda de citros você se deparou com uma planta apresentando sintomas característicos. O funcionário que lhe acompanha desconfia de ataque de insetos, mas você procura por sinais e descarta essa possibilidade explicando a ele que os sintomas não foram causados diretamente pelo ataque de insetos, mas que possivelmente se trata de *greening*, doença causada por bactéria e transmitida para as plantas de citros por inseto. O funcionário então o questionou: As bactérias que prejudicam as plantas são as mesmas que causam doenças nos seres humanos? A bactéria infectou a planta pelo ataque do inseto, mas como ela se reproduziu na planta? E quais seriam outros possíveis sintomas que uma planta infectada por bactérias poderia ter?

Para começar, você deve explicar ao funcionário da fazenda que as bactérias, assim como os demais organismos, possuem certa especificidade de vida e em relação aos efeitos que podem causar. Isso significa que as bactérias fitopatogênicas, que causam doenças nas plantas, possuem uma característica única de conseguir infectar e sobreviver em plantas, causando doenças a elas. Nesse sentido, uma bactéria fitopatogênica não causará doença em animais e seres humanos.

No caso do *greening*, a bactéria infectou a planta por meio do ataque de um inseto, mas uma vez na planta, ela conseguiu colonizar os tecidos, causando os sintomas apresentados, por meio de reprodução e crescimento. A reprodução trata-se da forma como os indivíduos irão se multiplicar, enquanto o crescimento é o aumento da sua quantidade no meio em que se encontra. Assim, ao penetrar no tecido vegetal, certamente a bactéria realizou reprodução assexuada, aquela em que não há troca de material genético, dividindo-se por meio de divisão binária ou por brotamento. Esse é o método mais comum de reprodução bacteriana. No primeiro processo, a célula duplica seus componentes, dividindo-se em duas. Já no segundo processo, uma pequena célula se desenvolve a partir da superfície de outra célula preexistente, separando-se da mãe.

Por fim, falta responder ao funcionário da fazenda sobre os possíveis sintomas que uma planta infectada por bactéria pode

apresentar. Neste caso, do *greening*, de maneira geral, a planta apresentou **manchas e necroses** caracterizadas por lesões em folhas, nos ramos e nos frutos. Além disso, a planta apresentou **hiperplasia e hipertrofia** pela multiplicação de ramos e folhas, além do engrossamento da casca do fruto.

Sintomas que não foram apresentados pela planta, mas poderiam ocorrer em caso de infecções de outras bactérias fitopatogênicas, seriam: a **podridão mole**, resultado da produção de enzimas que degradam a parede celular das plantas infectadas, e a **murcha**, que ocorre quando há obstrução dos vasos condutores, impedindo ou dificultando o transporte de água e nutrientes. Além da murcha, a planta poderia apresentar ainda nanismo e/ou clorose.

É importante dizer ao funcionário em sua explicação que a identificação das bactérias fitopatogênicas não deve ser baseada apenas nos sintomas que a planta apresenta, uma vez que vírus, fungos, nematoides ou até mesmo desequilíbrios nutricionais podem causar sintomas semelhantes. Além disso, uma mesma bactéria pode causar mais de um tipo de sintoma na planta.

Agora, além de responder o funcionário, você se vê frente a sua primeira tarefa: relatar esses sintomas e sua desconfiança sobre o possível tipo de agente causal para que o produtor possa tomar as devidas providências. Não deixe de elaborar seu relatório para o produtor e sinalizar que se fazem necessárias análises laboratoriais para a confirmação do agente causal.

Avançando na prática

Aumento de produtividade em soja

Descrição da situação-problema

Você é engenheiro agrônomo experiente em plantio, manejo e colheita de soja para grandes produtores rurais. No planejamento desta safra um dos produtores lhe procurou afirmando que gostaria de reduzir os custos com compra de fertilizantes nitrogenados, para tentar aumentar sua margem de lucro e, por esse motivo, deixaria a cultura sem fertilização. Você logo se assustou e disse ao produtor que essa não era a melhor saída para a redução de custos, uma vez que o nitrogênio é essencial para a produtividade da lavoura.

Você afirmou a ele que, a redução do custo com o fertilizante não era uma economia correta, uma vez que a produtividade da lavoura também seria menor.

O produtor então lhe questiona outra possibilidade de redução de custos no plantio sem ser no corte de fertilizante. Como você poderia orientar o produtor?

Resolução da situação-problema

Com base em seus conhecimentos em microbiologia agrícola, você deve explicar ao produtor que hoje, em virtude do avanço das pesquisas, já é possível realizar a adição de bactérias fixadoras de nitrogênio às sementes de leguminosas, como soja e feijão, antes do plantio. O processo é chamado de inoculação e o produto chamado de inoculante ou biofertilizante, sendo amplamente utilizado em outros países como o México e Argentina. Explique a ele que o uso dessa técnica pode substituir, sem prejuízos para a cultura, o uso de fertilizantes nitrogenados reduzindo os custos de produção, uma vez que o produto biológico é mais barato.

Faça valer a pena

1. As bactérias podem se apresentar basicamente de forma esférica, cilíndrica, cilíndrica curva ou de maneira espiral. As formas esféricas são aquelas que se apresentam de maneira mais homogênea em relação ao tamanho das células. Dependendo de como se organizam, eles tomam diferentes denominações, chamados arranjos.

Em relação aos arranjos bacterianos, analise a imagem a seguir:

Figura 2.8 | Diferentes arranjos bacterianos



(a)



(b)



(c)

Fonte: adaptada de <<https://goo.gl/zNT6pB>>. Acesso em: 2 jul. 2018.

Assinale a alternativa que apresenta a nomenclatura correta para cada forma e arranjo apresentado na imagem.

- a) (a) estafilococos; (b) estreptobacilos; (c) bastonete.
- b) (a) estafilococos; (b) estreptobacilos; (c) vibrião.
- c) (a) estreptococos; (b) bastonetes; (c) vibrião.
- d) (a) estreptococos; (b) tétrede; (c) sarcina.
- e) (a) sarcina; (b) estreptobacilos; (c) bastonete.

2. As bactérias geralmente realizam reprodução assexuada, por meio de divisão binária, também chamada cissiparidade, quando a célula duplica seus componentes dividindo-se em duas. Há ainda a reprodução por brotamento, que é quando uma pequena célula se desenvolve a partir da superfície de outra célula preexistente, separando-se da mãe.

Embora a reprodução bacteriana não seja sexuada, pode haver troca de material genético entre duas células diferentes, chamada recombinação genética.

Ao processo de recombinação genética bacteriana, em que há transferência de DNA por meio de um vírus bacteriófago, chamamos de:

- a) Transformação.
- b) Reprodução.
- c) Conjugação.
- d) Infecção.
- e) Transdução.

3. Quando falamos de bactérias fitopatogênicas, podemos elencar alguns tipos de sintomas comuns nas plantas infectadas. Chamamos de _____ o resultado da produção de enzimas pela bactéria que degradam a parede celular das plantas infectadas. Já a _____ irá ocorrer em virtude da obstrução dos vasos condutores pelas bactérias, impedindo ou dificultando o transporte de água e nutrientes.

Com base em seus conhecimentos sobre os possíveis sintomas de uma planta acometida por uma infecção bacteriana, assinale a alternativa que completa corretamente as lacunas:

- a) Necrose; podridão mole.
- b) Hiperplasia; necrose.
- c) Podridão mole; murcha.
- d) Hipertrofia; murcha.
- e) Podridão mole; hiperplasia.

Seção 2.2

Os fungos e sua interferência na produção agrícola

Diálogo aberto

Olá, aluno! Nesta unidade de ensino estamos conhecendo um pouco mais sobre a biologia dos microrganismos e seus efeitos nas culturas agrícolas, não é mesmo? Na primeira seção falamos sobre bactérias, e agora é a vez de falarmos sobre os fungos, importantes microrganismos para as culturas agrícolas, uma vez que sua disseminação pode gerar graves prejuízos, em contrapartida, com conhecimento e utilização adequada, algumas espécies podem trazer muitos benefícios em termos de produtividade, sanidade vegetal e segurança alimentar.

Para desenvolver nosso estudo, você será levado de volta ao seu trabalho como engenheiro agrônomo contratado por uma propriedade de citros.

Lembre-se que a propriedade em questão divide sua produção entre laranja, lima ácida e tangerina e a mudança de foco da indústria, para a produção de fruta de mesa obrigou os produtores a investir também na qualidade de seus produtos, principalmente em relação a sua aparência. Sendo assim, contrataram você para cuidar das doenças do pomar, evitando a diminuição da produtividade e mantendo a aparência sadia dos frutos que vão para a mesa.

A aparência dos frutos foi justamente o tema da reunião de hoje. Você foi chamado pelo produtor para esclarecer algumas dúvidas sobre uma doença que vem acometendo os frutos das laranjas e tangerinas do pomar. O sintoma relatado é a presença de manchas pretas e duras nos frutos dessas duas frutíferas; os caules e folhas não estão manchados, bem como os frutos de lima ácida, que aparentam estar sadios. O proprietário relata ainda que as manchas não provocaram alterações no sabor, sendo aceitos pela indústria de suco, entretanto os frutos infectados, estão impróprios para a mesa, devido à sua aparência manchada.

Na reunião você diz que desconfia que seja pinta preta, uma doença causada por fungos que atacam especialmente todas as variedades de limões, laranjas doces e tangerinas, exceto a lima ácida. Entretanto, os participantes dessa reunião têm alguns questionamentos a fazer, para que possam entender melhor o problema e, posteriormente, tomar as medidas necessárias de controle. Alguns dos questionamentos foram: os fungos que ocasionam doenças em plantas são os mesmos fungos que causam bolor no pão? Como eles se reproduzem, atacando os pomares? E existem fungos benéficos à agricultura?

Vamos orientar o produtor sobre mais esses pontos? Ao final desta seção, você será capaz de responder as perguntas do produtor além de elaborar um breve parecer sobre o tipo de microrganismo que está ocasionando essa doença no pomar. Pronto para começar?

Não pode faltar

Juntamente com as bactérias, os fungos podem ser encontrados em inúmeros lugares da Terra, sendo os principais decompositores da biosfera. Eles são importantes para o meio ambiente, para a indústria e para a agricultura.

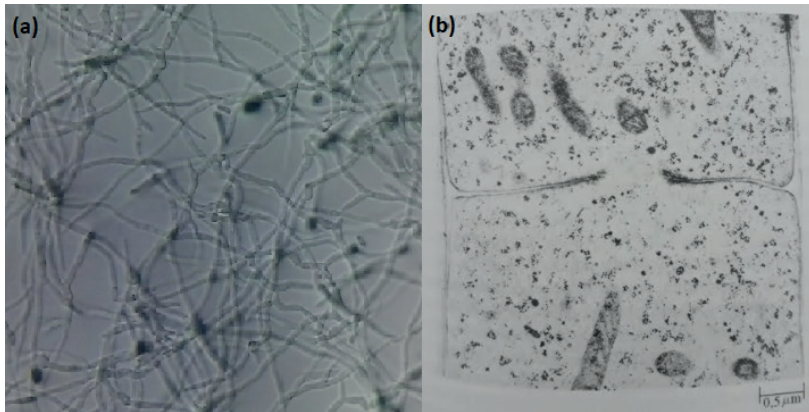
Com certeza você já relacionou os fungos em sua mente com leveduras, bolores de pão e cogumelos, não é mesmo? Todos eles possuem características semelhantes por estarem dentro do mesmo reino, o reino Fungi, entretanto cada um com suas peculiaridades, classificados de acordo com seus filios.

Durante muito tempo os fungos foram comparados e classificados como vegetais primitivos, entretanto, atualmente está claro que se tratam de organismos com características completamente diferentes, exceto que ambos possuem crescimento multicelular e possuem natureza séssil, ou seja, não se movem. Os fungos são eucariontes com parede celular constituída por quitina, enquanto os vegetais são seres eucariontes com parede celular formada por celulose. Além disso, são seres heterotróficos (não produzem seu próprio alimento) e não apresentam clorofila nas suas células, não realizando fotossíntese. Em sua maioria são aeróbicos, entretanto, existem algumas espécies anaeróbicas estritas e facultativas. Todos eles são seres eucariontes e podem ser unicelulares, como por exemplo as

leveduras, ou multicelulares, em sua maioria. Você verá ainda que os fungos possuem uma forma de vida diferente dos outros seres vivos, justificando possuírem um reino próprio.

Eles são essencialmente terrestres e aqueles que não possuem uma única célula, possuem estrutura filamentosa. Isso quer dizer que sua estrutura consiste em muitos filamentos densamente unidos, chamados **hifas**, e ao conjunto das hifas de um fungo denominado de **micélio** (Figura 2.9a). O crescimento das hifas ocorre rapidamente em um fungo, podendo esse chegar a produzir 1 km de micélio em 24 horas (EVERT; EICHHORN, 2014). As hifas podem ser **septadas**, morfologicamente divididas por paredes chamadas **septos**, ou **asseptadas**, quando possuírem um citoplasma comum, multinucleado (Figura 2.9b).

Figura 2.9 | (a) Hifas e micélio; (b) Elétron-micrografia de transmissão de um septo entre duas células



Fonte: (a) acervo do autor; (b) Evert; Eichhorn (2014, p. 282).

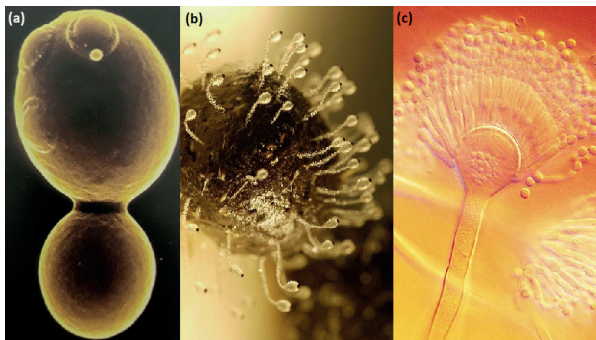
Outra característica dos fungos é que eles podem ter diferentes formas dependendo do ambiente em que se encontram. A essa característica chamamos de **dimorfismo**, e um exemplo de fungo dimórfico é o *Penicillium marneffe*, que no ambiente se desenvolve como um bolor, mas no corpo humano se desenvolve como uma levedura.

Eles se reproduzem através da formação de esporos que, por sua vez, podem ser formados tanto de maneira assexuada

quanto sexuada. Algumas espécies possuem dois ciclos em sua reprodução (um assexuado e outro sexuada), porém outras têm apenas o ciclo assexuado.

Começando pela reprodução assexuada, no reino Fungi ela pode ocorrer por meio da divisão celular mitótica por **brotamento**, como é o caso das leveduras (Figura 2.10a), pela formação de **esporos** em estruturas chamadas **esporângios** (Figura 2.10b) ou em células especializadas chamadas **conidiogênicas**, dependendo da espécie. Quando os esporos se formam nas células conidiogênicas eles podem ser únicos ou se formarem em cadeias. Neste último caso, a estrutura é chamada **conidióforo**, já os esporos são chamados de **conídios** (Figura 2.10c).

Figura 2.10 | Formação de esporos: (a) Levedura em brotamento; (b) Esporângios de *Pilobolus*; (c) Conidióforo e conídios de *Aspergillus*

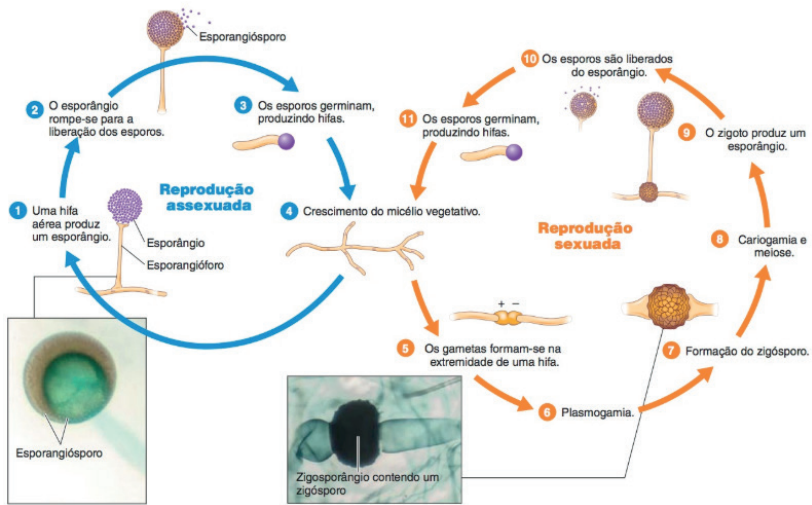


Fonte: (a) Black (2016, p. 277); (b) <<https://goo.gl/p8YiKa>>; (c) <<https://goo.gl/w4cxtA>>. Acesso em: 19 abr. 2018.

Já a reprodução sexuada apresenta três fases distintas. Uma delas ocorre pela união do citoplasma de gametas haploides em um processo chamado **plasmogamia**. Da plasmogamia pode-se originar uma célula com dois núcleos (dicariótica) ou haver a fusão desses dois núcleos em um processo chamado **cariogamia**, formando uma célula diploide. Essas células, por sua vez, produzem células descendentes haploides, também chamadas de esporos. Outros fungos podem se reproduzir sexuadamente durante a sua fase dicariótica. Comumente, eles ocorrem por fases haplóides, dicarióticas e diploides em um mesmo ciclo de vida, como é o caso dos fungos ascomicetos, que estudaremos mais adiante.

Os esporos são facilmente dispersados pela água, pelo vento, pelos animais e também por nós humanos, permitindo com que o fungo germine e se multiplique em outras plantas. Veja na Figura 2.11 um exemplo de reprodução em fungos, contendo um ciclo assexuado e um ciclo sexuado:

Figura 2.11 | Método de reprodução sexuada em fungos, com ciclo assexuado e sexuado



Fonte: Tortora et al. (2017, p. 325).

De acordo com suas características morfo e fisiológicas, principalmente de suas estruturas reprodutoras, os fungos são classificados em filós. Atualmente a quantidade de filós é dinâmica pois a taxonomia dos fungos encontra-se em estudo constante, em virtude dos avanços em pesquisas de biologia molecular, baseadas em comparações de DNA. Estes estudos alteram constantemente as classificações mais antigas. Por motivos didáticos, focaremos aqui apenas naqueles filós com maior

importância agrícola, sendo: *Microsporidia*, *Chytridiomycota*, *Ascomycota* e *Basidiomycota*.

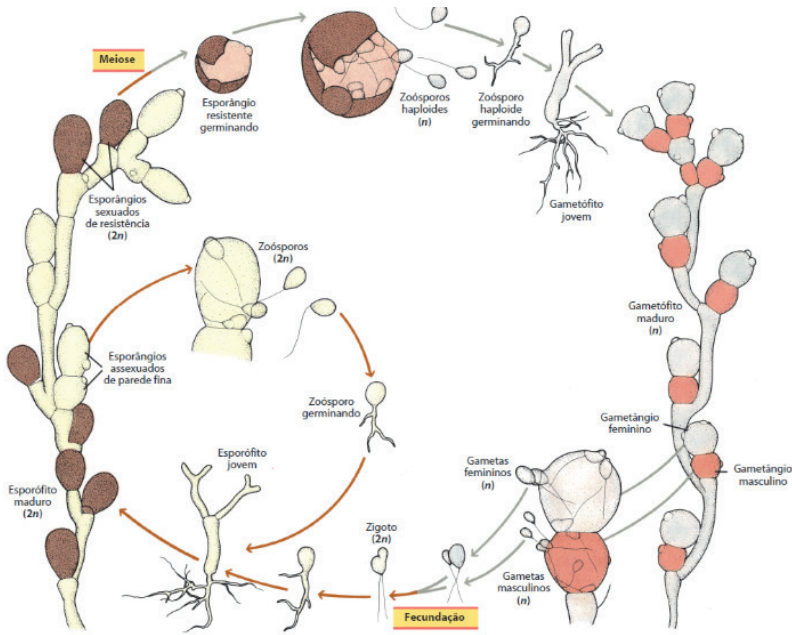
O primeiro filo que estudaremos é o ***Microsporidia***, conhecidos como fungos formadores de esporos, eles são unicelulares e parasitas de animais. De acordo com Evert e Eichhorn (2014), eles foram durante muito tempo considerados protozoários, entretanto, novos estudos moleculares indicam que eles deveriam ser classificados dentro do reino Fungi.

Um diferencial desse grupo é que todas as células dos microsporídios possuem um tubo polar que permite sua penetração na membrana plasmática da célula do hospedeiro. A partir dessa penetração o fungo transfere seu conteúdo, começa a se multiplicar e a obter energia. Segundo Evert e Eichhorn (2014), algumas espécies se reproduzem apenas de modo assexuado, contudo outras podem produzir esporos sexuados ou assexuados.

Os fungos do filo ***Chytridiomycota***, chamados de quitrídios, são predominantemente aquáticos, e também são encontrados em solos de vários tipos, às margens de represas e até mesmo em desertos. Existem espécies parasitas de algas, protozoários, grãos de pólen e outras partes de plantas, podendo, inclusive, ser patógenas. Exemplos de quitridiomycetos fitopatogênicos são os fungos do gênero *Physoderma spp*, que causam a mancha em milho e verugose na alfafa. Outras espécies são sapróbias, que se alimentam de matéria orgânica em decomposição, em diferentes substratos ou em insetos mortos. Algumas espécies parasitam larvas de mosquitos, sendo importantes no controle desses insetos (SILVA; COELHO, 2006).

Os quitrídios apresentam diferentes modos de reprodução, podendo exibir alternância de gerações isomórficas (indivíduos haploides e diploides possuem semelhança entre si) ou heteromórficas (indivíduos haploides e diploides não possuem nenhuma semelhança entre si) dependendo da espécie. De maneira geral, esses fungos possuem hifas simples, chamadas talos, que apresentam septos apenas nos esporófitos. Suas células reprodutoras (tanto zoósporos quanto gametas) são flageladas e móveis (Figura 2.12).

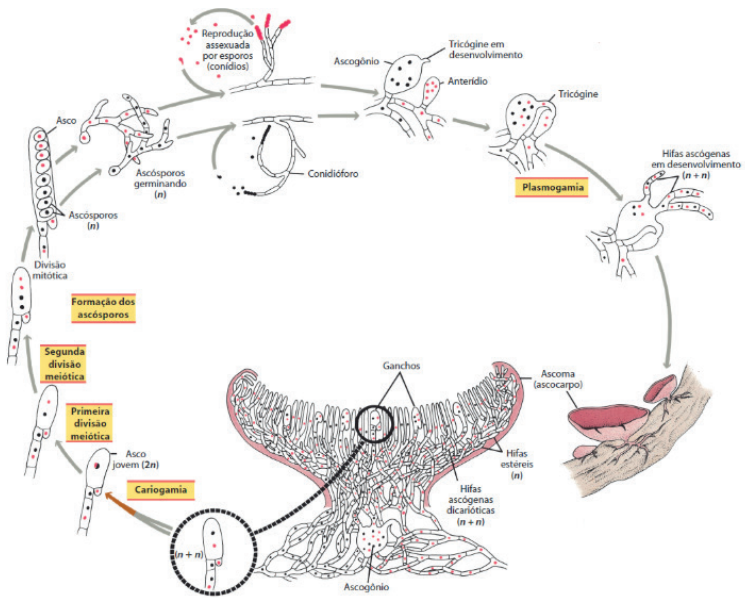
Figura 2.12 | Ciclo de vida de um quitrídio



Fonte: Evert; Eichhorn (2014, p. 288).

Já os indivíduos do filo **Ascomycota**, os ascomicetos, se diferem dos demais grupos por possuírem estruturas em forma de sacos, denominadas **ascos**, que são responsáveis por sua reprodução sexuada. São nos **ascocarpos**, estruturas compostas por hifas entrelaçadas, que são formados os ascos e, por sua vez, os **ascosporos**. A reprodução assexuada ocorre pela formação e posterior liberação de conídios por meio dos conidióforos (Figura 2.13).

Figura 2.13 | Ciclo de vida de um ascomiceto



Fonte: Evert; Eichhorn (2014, p. 292).

Algumas espécies de ascomicetos são sapróbias; outras são utilizadas no controle biológico de pragas, como os fungos *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Nomuraea rileyi*, e ainda outras são fitopatogênicas, como é o caso do fungo *Guignardia citricarpa* que causa a pinta preta do citros, e o *Cryphonectria parasitica*, que acomete folhas de castanheiras, ambos comprometendo o desenvolvimento e produção das culturas (EVERT; EICHHORN, 2014; SILVA; COELHO, 2006).

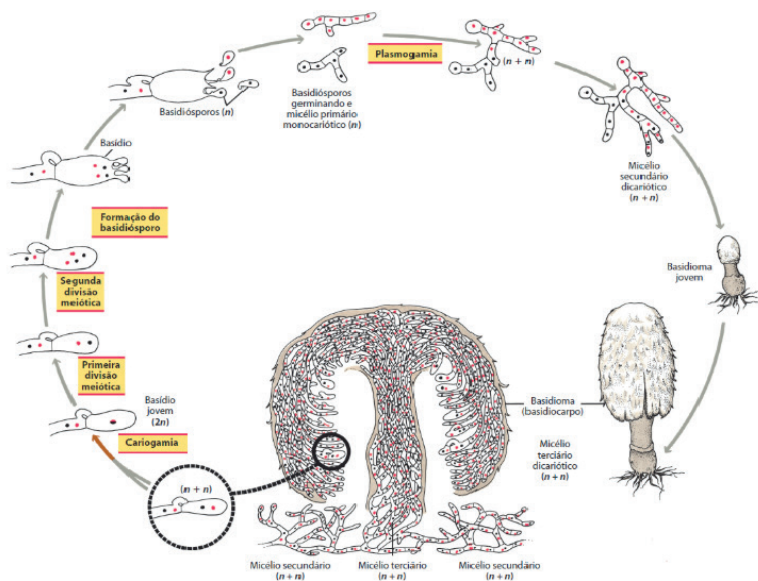
Pode parecer estranho, mas, além dos fungos filamentosos (que produzem hifas) citados, a maior parte das espécies de leveduras também são ascomicetos unicelulares. Elas se reproduzem de maneira diferente da apresentada na Figura 2.13 se reproduzindo por divisão binária ou por brotamento, todavia algumas leveduras podem também expor crescimento micelial em condições ambientais favoráveis.

Os fungos basidiomicetos, agrupados no **filo Basidiomycota**, por sua vez, são os cogumelos, orelhas de pau, os fungos gelatinosos, as ferrugens e os carvões, além de algumas espécies unicelulares. Eles

são terrestres na grande maioria, entretanto você deve ter percebido que algumas espécies são fitopatogênicas, como aquelas que causam doenças como ferrugens e carvões. Nesse grupo também podemos encontrar espécies liquenizadas, que são associações simbióticas de fungos com algas.

Uma característica especial desses fungos é a produção, de origem sexuada, dos esporos chamados **basidiósporos** em uma estrutura chamada **basídio**, que por sua vez está localizada nos **basidiomas**. Em um ciclo de vida típico de um basidiomiceto, os basidiósporos germinam, formando micélios septados. As células deste micélio se unem por plasmogamia formando basídios, que por sua vez formarão basidiósporos (Figura 2.14).

Figura 2.14 | Ilustração do ciclo de vida de um basidiomiceto.



Fonte: Evert; Eichhorn (2014, p. 296).



Pesquise mais

Quer conhecer mais sobre os filamentos do Reino Fungi e a atual classificação dos fungos? Acesse o material indicado abaixo que faz um panorama geral de cada filo de maneira resumida e didática:

AZEVEDO, A. **Classificação dos Fungos**. Universidade Federal de Juiz de Fora, Departamento de Microbiologia, 2017. Disponível em: <<http://www.ufjf.br/microbiologia/files/2013/05/Taxonomia-dos-fungos.pdf>>. Acesso em: 23 abr. 2018.

Mudando nosso foco da biologia dos fungos e focando mais especificamente no prejuízo que eles podem causar às culturas agrícolas, conheceremos alguns sintomas típicos que as plantas apresentam ao ser acometidas por fungos fitopatogênicos.

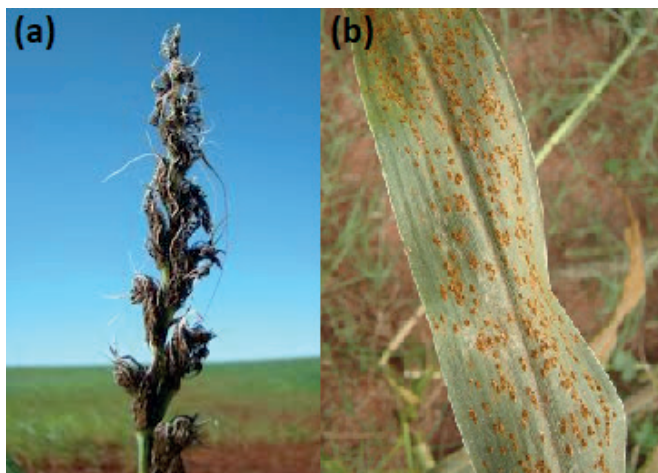
Os fungos ascomicetos geralmente causam sintomas de fácil reconhecimento, pois **crecem na superfície do hospedeiro em colônias**. As manchas circulares esbranquiçadas podem crescer até que o órgão vegetal fique completamente acometido (Figura 2.15). Já os **carvões** (Figura 2.16a) e as **ferrugens** (Figura 2.16b), também de fácil reconhecimento, são formados pelos fungos basidiomicetos, estando entre as doenças que mais acometem plantas no mundo todo (TRIGIANO et al, 2010).

Figura 2.15 | Sintomas de *Podosphaera pannosa* em roseira



Fonte: <<https://goo.gl/UB3Cft>>. Acesso em: 24 maio 2018.

Figura 2.16 | (a) Carvão do trigo; (b) Ferrugem do milheto



Fonte: (a) <<https://goo.gl/m5Y1jT>>; (b) <<https://goo.gl/Ggknep>>. Acesso em: 23 abr. 2018.



Refleta

Os fungos, assim como as bactérias, podem também apresentar sintomas como **podridão mole, murcha, manchas e necroses** já estudadas na seção anterior. Nesses casos, quando os sintomas forem ser parecidos, como é possível diferenciar e identificar o agente causal da doença?

Além destes sintomas, podem ocorrer ainda alterações na fisiologia da planta hospedeira, como na respiração e na transpiração do hospedeiro. Nestes casos, dependendo do estágio de colonização do patógeno, a planta pode expor um **aumento ou redução na taxa de transpiração**.



Exemplificando

Bananeiras e tomateiros, quando infectados pelo fungo *Fusarium oxysporum* (filo *Ascomycota*), expõem uma elevação na taxa de transpiração nos primeiros dias de ataque e, posteriormente, murcha e baixa taxa de respiração pela inibição do sistema de transpiração (COUTINHO, 2006).

Outros sintomas podem ser a **escaldadura**, caracterizada pela despigmentação da epiderme de órgãos aéreos; **estrias**, lesões estreitas, alongadas e paralelas à nervura das folhas de espécies de monocotiledôneas; **gomose**, quando há exsudação de goma pelas lesões, principalmente em espécies frutíferas; **morte dos ponteiros**, quando há morte progressiva de ponteiros e ramos jovens de árvores; **mumificação**, quando os frutos apodrecidos pelo ataque do patógeno, tornam-se secos e duros rapidamente, conhecidos como múmia; **perfuração**, que é a queda do tecido necrosado, ocasionando uma deformidade ou ainda a **roseta**, que é o encurtamento dos entrenós, ramos ou brotos (GOMES, 2013).

Em contrapartida, os fungos também podem trazer benefícios às culturas agrícolas, estando presentes naturalmente no solo. Com o auxílio de pesquisas biotecnológicas, hoje algumas espécies, após serem isoladas, são multiplicadas em laboratório e utilizadas como inoculantes para aumento de produtividade, como agentes de biocontrole de pragas e até também de doenças.

Assim como as bactérias, eles podem ser inoculados nas sementes antes da semeadura, onde, após a germinação das sementes, eles penetrarão nas raízes das plantas dando início a uma associação simbiótica, trazendo aumento na capacidade de absorção das raízes (fósforo, nitrogênio e potássio) e, conseqüentemente, aumentando a produtividade.

Além disso, os fungos podem ser entomopatogênicos, realizando o controle de insetos e também proporcionar o controle de outras doenças de plantas, como é caso dos fungos do gênero *Trichoderma*. Eles são naturalmente decompositores de madeira e material herbáceo, e atualmente são aplicados como agentes de biocontrole no setor agrícola, com um crescente número de produtos novos registrados no mundo todo. Isso é possível devido às suas propriedades antagônicas aos fitopatógenos, possibilitando que sejam capazes de controlar muitas doenças.

Outro benefício é ainda o controle de nematoides fitopatogênicos, que são responsáveis por grandes danos na agricultura no mundo todo. Os fungos nematófagos, assim conhecidos, apresentam estratégias de infecção e captura de nematóides, podendo ser divididos em: patógenos (produzindo metabólitos tóxicos), predadores, endoparasita ou oportunistas (parasitando ovos e fêmeas sedentárias).



Pesquise mais

Quer saber como os fungos realizam a infecção de captura de nematoides? Assista o vídeo *Nematófagos* indicado a seguir.

Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=NVkVYGllftk>>.

Acesso em: 23 abr. 2018.

Sem medo de errar

Você estudou nessa seção que os seres vivos do reino Fungi possuem grande importância agrícola, tanto por seus efeitos negativos quanto positivos. Eles podem ser extremamente benéficos, responsáveis pela decomposição dos restos de plantas e animais, utilizados como biocontroladores de pragas e doenças e ainda servir de inoculantes para melhorar a absorção de nutrientes pelas plantas. Entretanto, outras espécies podem provocar prejuízos às culturas por causar doenças aos vegetais e degradar produtos armazenados.

Nesse sentido, você foi levado de volta ao seu trabalho como engenheiro agrônomo contratado por uma propriedade de citros e, precisa orientar os produtores sobre o agente causal de uma doença que vem prejudicando a aparência dos frutos que vão para a mesa. O sintoma é a presença de manchas pretas e duras nos frutos dessas duas frutíferas. O proprietário relatou que as manchas não provocaram alterações no sabor, sendo aceitos pela indústria de suco, entretanto os frutos infectados estão impróprios para a mesa, devido à sua aparência manchada.

Na reunião você apresenta que a doença é possivelmente pinta preta, causada por fungo, mas os participantes da reunião têm alguns questionamentos a fazer, para que possam entender melhor o problema e, posteriormente, tomar as medidas necessárias de controle. **Os fungos que ocasionam doenças em plantas são os mesmos fungos que causam bolor no pão? Como eles se reproduzem, atacando os pomares? E existem fungos benéficos à agricultura?**

Para começar sua explicação, inicie apresentando os fungos como seres vivos heterótrofos decompositores, significando que

precisam de outro ser vivo ou substrato para se alimentarem, uma vez que não produzem seu próprio alimento. Em virtude disso, eles podem se alimentar de restos animais e vegetais em decomposição, causar doenças em seres vivos, como animais e vegetais, ou ainda serem utilizados de maneira benéfica. Respondendo à primeira pergunta, explique que os fungos que ocasionam doenças em plantas estão alocados no mesmo reino em que se encontram as leveduras, o bolor de pão e os cogumelos: o reino Fungi. Contudo, de acordo com as características e peculiaridades de cada um, eles foram agrupados em diferentes filos. Atualmente temos propostos sete filos, sendo *Microsporidia*, *Chytridiomycota*, *Ascomycota* e *Basidiomycota*, aqueles com maior número de espécies de importância agrícola.

Você pode aproveitar esse momento para explicar brevemente as características de cada filo e responder à pergunta sobre os efeitos positivos na agricultura. Apresente que os **microsporídios** causam doenças em animais; os **quitrídios** podem se nutrir de matéria orgânica em decomposição, ser parasitas de algas, protozoários, patógenas de plantas e, inclusive serem parasitas de larvas de alguns mosquitos, servindo como biocontroladores desse inseto; os **ascomicetos**, por sua vez, podem se alimentar de matéria orgânica em decomposição, ser utilizados no controle biológico de pragas, ou ainda também ocasionar doenças em plantas; por fim, os **basidiomicetos** são conhecidos como cogumelos e orelhas de pau, fungos responsáveis por causar doenças como ferrugens e carvão.

Os fungos podem se reproduzir tanto de maneira sexuada quanto assexuada. A reprodução assexuada ocorre por divisão binária, por brotamento ou pela formação de esporos em estruturas chamadas esporângios ou células conidiogênicas, dependendo da espécie. Quando os esporos se formam nas células conidiogênicas eles podem ser únicos ou se formarem em cadeias. Neste último caso, a estrutura é chamada conidióforo e os esporos chamados de conídios.

Já a reprodução sexuada pode ocorrer pela união do citoplasma de gametas haploides em um processo chamado plasmogamia e pela produção de células descendentes haploides, também chamadas de esporos. Alguns fungos passam por fases assexuadas e sexuadas dentro do mesmo ciclo de vida. Os esporos são facilmente

dispersados pela água, pelo vento, pelos animais e também por nós humanos, permitindo com que o fungo germine e se multiplique em outras plantas, como as do pomar.

Com isso, encerre sua orientação na reunião e não deixe de elaborar um breve parecer sobre o tipo de microrganismo que está ocasionando essa doença no pomar. Lembre-se de orientar em seu parecer que uma descrição mais detalhada dependerá da confirmação e identificação do patógeno por meio de atividades laboratoriais e postulados de Koch, conforme já estudado na Unidade 1 dessa disciplina.

Avançando na prática

Controle de fitonematóides

Descrição da situação-problema

Uma cooperativa de produtores de hortaliças orgânicas vem enfrentando problemas em virtude da baixa produtividade e qualidade de seus produtos, principalmente a alface. Os produtores estavam se queixando de amarelecimento das folhas, cabeças de alface menores, mais leves e com folhas soltas e murchas – motivos pelos quais contrataram você para consultoria nas hortas.

Ao visitar o local você verificou esses sintomas e ainda a presença de galhas no sistema radicular das plantas. Enviando amostra de solo para análise, o resultado foi como você desconfiava: nematoide-das-galhas nas áreas de cultivo. Como se trata de uma produção de orgânicos, pense em uma alternativa viável para controle dessa praga. O que você orientaria para controlar esses nematoides, já que os defensivos não são permitidos?

Resolução da situação-problema

Como se trata de um cultivo orgânico de hortaliças, o controle químico para os fitonematóides da área de produção não será possível. Sendo assim, você (agrônomo) conhecedor da microbiologia agrícola poderá indicar o uso de fungos para o biocontrole dessa praga. Os fungos nematófagos, assim conhecidos, apresentam estratégias de infecção e captura de nematóides, podendo ser divididos em: patógenos (produzindo metabólitos tóxicos), predadores,

endoparasita ou oportunistas (parasitando ovos e fêmeas sedentárias). Trata-se de uma alternativa viável e ecológica, podendo ser utilizada sem problemas no cultivo orgânico.

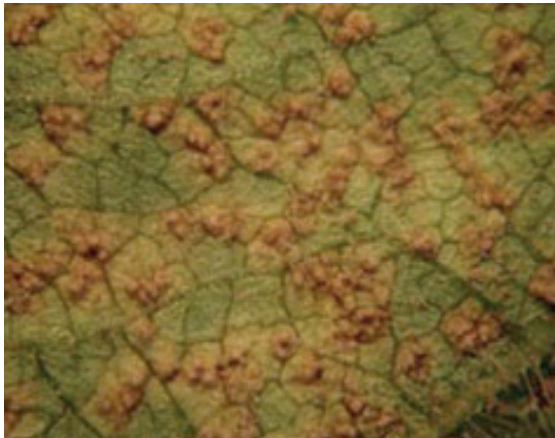
Faça valer a pena

1. A primeira constatação da ferrugem asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, em lavouras no Brasil, ocorreu na safra 2001/02 e rapidamente espalhou-se pelas principais regiões produtoras, em função da eficiente disseminação pelo vento.

O nível de dano que a doença pode ocasionar depende do momento em que ela incide na cultura, das condições climáticas favoráveis à sua multiplicação, da resistência/tolerância e do ciclo da cultivar utilizada.

A confirmação da ferrugem é feita pela constatação no verso da folha, de saliências semelhantes a pequenas feridas (bolhas), que correspondem à estrutura de reprodução do fungo (ABDELNOOR; MARCELINO; NEPOMUCENO, [s.d.]).

Figura 2.17 | Sintoma de ferrugem em folha de soja



Fonte: <<https://goo.gl/82gVSz>>. Acesso em: 25 abr. 2018.

É possível afirmar que o fungo causador da ferrugem asiática pertence ao filo:

- a) *Chytridiomycota*.
- b) *Microsporidia*.
- c) *Basidiomycota*.
- d) *Ascomycota*.
- e) *Glomeromycota*.

2. O mofo cinzento representa uma importante e frequente doença do morangueiro, por ser uma doença típica de frutos, todavia pode afetar também pecíolos, folhas, botões florais, pétalas e pedúnculos sob condições favoráveis. Os morangos são frutas muito perecíveis o que deixa a fruta susceptível ao ataque de micro-organismos causando importantes perdas na pós-colheita.

Fonte: RESENDE et al. (2016). **Controle de mofo cinzento na cultura do morangueiro.** Disponível em: <<https://goo.gl/suFBEz>>. Acesso em 25 abr. 2018.

Analise a imagem a seguir e veja que o fruto inicialmente possui uma pequena colônia de fungo que se desenvolve gradativamente até que fique completamente tomado. Na última etapa o morango encontra-se apodrecido pelo ataque do patógeno, tornando-se secos e duro.

Figura 2.18 | Evolução do mofo cinzento em morango



Fonte: <<https://goo.gl/9Jm6Tf>>. Acesso em: 25 abr. 2018.

Podemos definir o sintoma que está ocorrendo com o morango na Figura 2.18 como:

- a) Roseta.
- b) Escaldadura.
- c) Gomose.
- d) Perfuração.
- e) Mumificação.

3. A mancha preta dos citros (MPC), causada pelo fungo *Guignardia citricarpa*, é a principal doença fúngica da cultura no Brasil. Todas as principais variedades comerciais de laranjeiras doces são suscetíveis ao patógeno, que deprecia comercialmente os frutos para o mercado in natura, além de provocar sua queda antes do período de colheita. O fungo agente causal da MPC *Guignardia citricarpa* Kiely, pertence ao filo ascomiceto, ordem *Dothideales* e família *Botryosphaeriaceae* Scaloppi (2010).

Em relação ao filo ascomiceto, analise as asserções a seguir:

- I. São fungos unicelulares e parasitas de animais.
- II. Os fungos *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Nomuraea rileyi* são outros exemplos de fungos que compartilham do mesmo filo.
- III. São fungos terrestres em sua grande maioria.
- IV. Se diferem dos demais grupos por possuírem estruturas em forma de sacos que são responsáveis por sua reprodução sexuada.

Qual alternativa contém apenas as asserções corretas apresentadas no texto-base?

- a) Apenas I e II são corretas.
- b) Apenas II e IV são corretas.
- c) Apenas I, II e III são corretas.
- d) Apenas I, III e IV são corretas.
- e) Apenas I e III são corretas.

Seção 2.3

Os vírus e sua interferência na produção agrícola

Diálogo aberto

Olá, aluno! Estamos chegando ao final da Unidade 2 de seu estudo sobre a microbiologia agrícola. Até aqui você entendeu um pouco mais sobre a vida das bactérias e dos fungos, conhecendo os sintomas que eles podem causar nas plantas e os efeitos positivos que podem nos proporcionar em contrapartida.

Agora, esta última seção será destinada aos vírus, agentes infecciosos que possuem estrutura e ciclo de infecção bem diferente de tudo o que vimos até agora. Não são considerados seres vivos, entretanto, ao invadir células hospedeiras susceptíveis, eles apresentam características que os colocam em um patamar diferente dos demais. Vamos conhecer um pouco mais sobre eles e como eles afetam nosso cotidiano no agronegócio.

Nesse sentido, retomaremos seu trabalho como engenheiro agrônomo contratado por uma empresa que realiza o cultivo de citros. Lembre-se que a empresa em questão divide sua produção entre laranja, lima ácida e tangerina.

Você foi contratado como especialista em microbiologia para cuidar das doenças do pomar, evitando a diminuição da produtividade bem como garantindo a manutenção da aparência sadia dos frutos que vão para a mesa. Para isso, deverá levantar os tipos de microrganismos existentes na propriedade de citros bem como o tipo de dano que eles podem causar.

Em um dia rotineiro de campo, você observa alguns sintomas diferentes que não haviam sido antes observados. As folhas de algumas laranjeiras apresentavam lesões arredondadas, lisas e de coloração verde clara e amarelada, tanto em sua face superior quanto inferior. Além disso, alguns frutos estavam apresentando lesões rasas e necróticas em sua superfície. Essas lesões escuras possuíam um halo amarelo, diferente da pinta preta já identificada há alguns dias atrás.

De uma coisa você tem certeza: seja o que for que está causando

essas lesões, precisa ser identificado e controlado imediatamente, antes que se espalhe e prejudique a produção e qualidade das laranjas. Sendo assim, você descarta a possibilidade de ataque por insetos, visto que não encontrou nenhum sinal deles, coleta algumas folhas e frutos, e leva ao laboratório para que sejam analisadas.

Sua análise em lupa identifica o ácaro *Brevipalpus phoenicis* e logo você imagina que os sintomas possam se tratar de leprose dos citros, doença causada por vírus e transmitida pelo ácaro encontrado. E agora? Como informar ao produtor que mais uma doença atacou o seu pomar? Como você irá descrever o tipo de agente causal da doença? Como eles se replicam? E como explicar a relação entre o ácaro e o vírus?

Para lhe ajudar, nesta seção você conhecerá um pouco mais sobre os componentes dos vírus, sua classificação, reprodução e principais sintomas que podem causar quando atacam as culturas agrícolas. Além de formalizar com o produtor sobre esse novo agente infeccioso em seu pomar, você deve entregar o relatório de suas visitas e orientações do mês que se passou. Sendo assim, ao final desta seção, não deixe de consolidar todas as informações levantadas nas visitas anteriores! Mãos à obra e bons estudos!

Não pode faltar

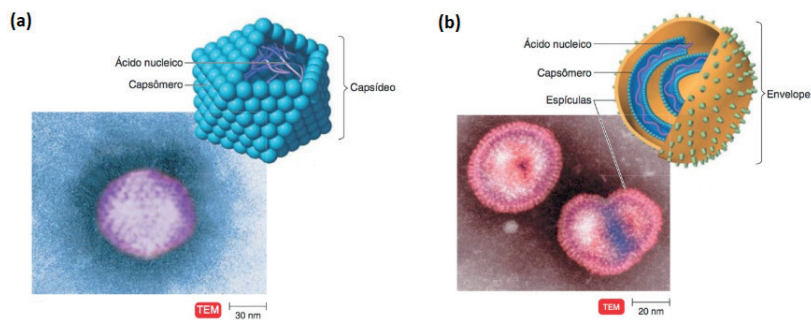
Os vírus são agentes infecciosos microscópicos, porém muito pequenos para serem visualizados em um microscópio óptico; são menores e mais simples que as células eucariontes e procariontes (BLACK, 2016). Eles diferem das células em diferentes aspectos, por exemplo, o fato de que as células contêm tanto DNA quanto RNA, enquanto que as partículas virais possuem somente um tipo de ácido nucleico, sendo o DNA ou o RNA (nunca ambos ao mesmo tempo). Outro fato é que as células crescem e se dividem, diferentemente dos vírus, que não possuem metabolismo próprio, dependendo da estrutura e funcionamento de uma célula para sua replicação, motivo pelo qual não podemos chamá-los de seres vivos, mas de parasitas intracelulares obrigatórios.

Para você possa ter ideia do tamanho de um vírus, uma célula pode ter cerca de 1000 vezes volume de um vírus que a infecta (BLACK, 2016). Em virologia as unidades de medidas utilizadas são:

Micron ($\mu = 1/1000$ mm); nanômetro (nm = 1/1000 000 mm) e ângstrom (= 1/10 000 000 mm).

Um vírus tipicamente possui um cerne de **ácido nucleico** (que será DNA ou RNA, conforme já citado anteriormente) e um revestimento de proteínas, chamado **capsídeo**, e ainda pode possuir uma membrana formada por uma bicamada de lipídios e polissacarídeos, chamada **envelope**. De acordo com Black (2016), uma partícula viral completa, com ácido nucleico, capsídeo e envelope é chamada de **vírião**. O capsídeo de um vírião é composto por associações de um ou mais tipos de proteínas, que formam unidades estruturais chamadas **capsômeros**. Já ao conjunto de ácido nucleico, juntamente com o capsídeo de um vírião é chamado **nucleocapsídeo**. Para alguns gêneros, o vírião pode constituir-se apenas de nucleocapsídeo, não sendo necessário envelope (Figura 2.19).

Figura 2.19 | Componentes de um vírus típico: (a) vírus não envelopado; (b) vírus envelopado (vírião).



Fonte: adaptada de Tortora et al. (2017, p. 361).

Os vírus envelopados adquirem sua bicamada lipídica quando se movem pela membrana de suas células hospedeiras. Sendo assim, eles adquirem seus envelopes após a sua formação nas mesmas. Alguns ainda podem possuir **espículas**, que são projeções do envelope viral e servem para que o vírião possa se fixar à superfície de células específicas (células estas susceptíveis).

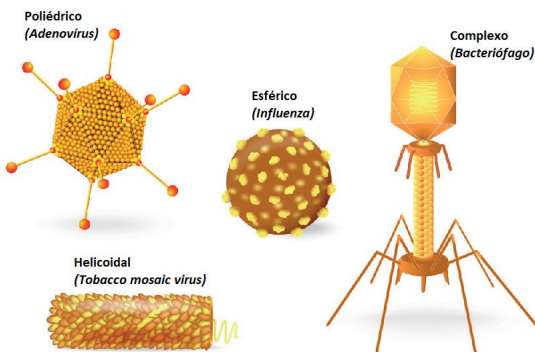


Como os envelopes são adquiridos das membranas da célula hospedeira, os vírus se tornam similares a elas, podendo passar despercebidos pelo sistema imunológico do seu hospedeiro. Além disso, os envelopes também auxiliam esses agentes a infectarem novas células por meio de sua fusão com a membrana plasmática do hospedeiro (BLACK, 2016).

Os vírus podem possuir diferentes tamanhos e formas geométricas, variadas de acordo com cada família viral, por exemplo. O componente que concederá a variação das suas formas geométricas é o capsídeo.

Um capsídeo **helicoidal** é constituído por uma proteína em forma de fita, que forma uma estrutura espiral ao redor do ácido nucleico do vírus. Um capsídeo **poliédrico** é organizado de forma a possuir muitas faces triangulares, sendo que o número das faces e dos ângulos poderá variar de acordo com o tipo de associação entre as proteínas estruturais do vírus. Já o capsídeo **complexo**, por sua vez, trata-se de uma combinação das formas helicoidais (formato da cabeça) e icosaédricas (formato da cauda). Os vírus envelopados, por sua vez, apresentam forma esférica, e podem possuir, em seu interior, um capsídeo poliédrico ou helicoidal, por exemplo (BLACK, 2016) (Figura 2.20).

Figura 2.20 | Formas virais



Fonte: adaptada de <<https://goo.gl/1fFA8e>>. Acesso em: 25 out. 2018.



Assimile

Diferentes técnicas podem ser utilizadas para a visualização dos vírus; uma delas é chamada de cristalografia de raios X, utilizada para a determinação da estrutura física e das dimensões da partícula viral. A microscopia eletrônica também possibilita a visualização da morfologia dos vírus, mas é mais utilizada para diagnosticar infecção de vírus em amostras de células e de tecidos animais e vegetais.

De acordo com Black (2016), antes do conhecimento sobre a estrutura e as propriedades químicas dos vírus, os virologistas classificavam os vírus pelo tipo de hospedeiro infectado, ou até mesmo pelo tipo de estruturas que eram atingidas. Assim, eram classificados como bacteriófagos, vírus de plantas ou vírus de animais, respectivamente.

Atualmente, em virtude de maiores estudos e conhecimento adquirido, passou-se a classificar os vírus baseando-se no tipo de estrutura, no tipo de ácido nucleico, nos métodos de replicação e nos hospedeiros. Quanto mais os vírus são estudados, mais complexos tornam-se os sistemas de classificação, que por vezes chegam a ser conflitantes (BLACK, 2016).

A classificação por ácidos nucleicos divide os vírus em vírus de DNA ou vírus de RNA. A maioria dos **vírus de DNA** possuem ácido nucleico de fita dupla (DNA *fd*), embora também existam representantes de fita simples (DNA *fs*). Os vírus de RNA, por sua vez, podem ser de **fita simples** (RNA *fs*) ou de **fita dupla** (RNA *fd*). Além disso, devido ao fato de muitas das células eucariontes não possuírem enzimas capazes de copiar as moléculas de RNA viral, esses vírus devem carregar as suas próprias enzimas ou possuir genes em seu genoma capazes de sintetizá-las. O vírus poderá ser **fita positiva (+), tendo seu RNA** diretamente traduzido pelos ribossomos citoplasmáticos da célula alvo ou **fita negativa (-)**, que necessitam da presença da enzima RNA polimerase no interior do vírion.



Pesquise mais

Quer conhecer um pouco mais sobre a classificação dos vírus? Em sua biblioteca virtual o livro de microbiologia indicado a seguir traz uma interessante tabela com diferentes famílias virais e características de cada uma delas. A Tabela 13.2 se encontra nas páginas 365-366. Não deixe de conferir!

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. Disponível em: <<https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582713549/cfi/386!4/4@0.00:0.00>>. Acesso em: 3 maio 2018.

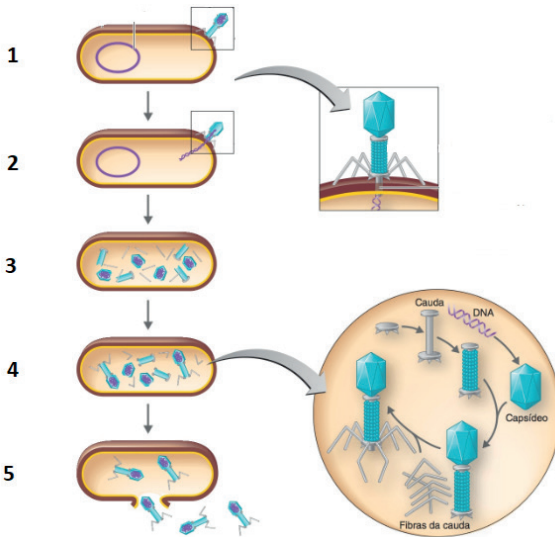
Conforme vimos até aqui, os vírus podem infectar diferentes tipos de organismos vivos. Mas você sabe como ocorre a multiplicação desses agentes? Diferentemente dos seres vivos, a esse processo nos vírus não chamamos de reprodução, e sim **replicação**.

A replicação viral depende de alguns estágios, e cada vírus segue uma estratégia diferente, entretanto, o princípio geral da infecção viral é o mesmo para todos (princípio este que estudaremos aqui): a utilização da célula hospedeira para produção de novas partículas virais. Didaticamente utilizaremos o exemplo de um vírus bacteriófago, que é o mais utilizado em todas as bibliografias da área.

A replicação de um vírus segue as seguintes etapas: 1 - adesão do vírus à célula; 2 - penetração do mesmo; 3 - biossíntese; 4 - Maturação/montagem das partículas virais e 5 - liberação (Figura 2.21).

Resumidamente, o ciclo se inicia quando o vírus se adere à célula hospedeira. Posteriormente, há a penetração e injeção de seu DNA no interior da célula. A partir desse momento, com o seu material genético no interior da célula, o vírus passa a direcionar a síntese de seus componentes e sua organização, formando os vírions. Por fim, há a liberação das partículas virais. Nessa última etapa a célula hospedeira se rompe (lise celular) e novos vírions são liberados (TORTORA et al., 2017). No caso dos vírions envelopados, é nesse momento que eles adquirem sua dupla membrana (envelope).

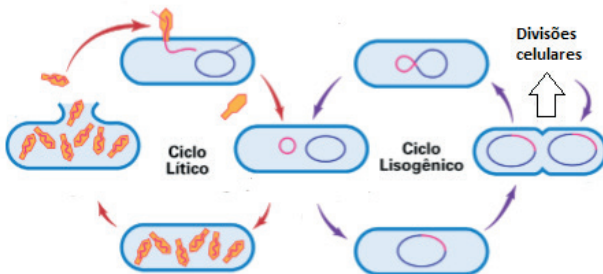
Figura 2.21 | Ciclo lítico de um vírus bacteriófago. (1) Adesão; (2) penetração; (3) síntese de componentes virais; (4) formação dos vírions; (5) liberação das partículas virais



Fonte: adaptada de Tortora et al. (2017, p. 370).

Quando ocorre a liberação dos novos vírus, o processo de multiplicação é denominado **ciclo lítico** (Figura 2.21), entretanto, existe um outro ciclo alternativo, chamado **ciclo lisogênico**, que é quando o material genético do vírus se integra ao material genético da célula hospedeira. Veja na Figura 2.22 a diferença entre os ciclos:

Figura 2.22 | Esquema de ciclo lítico e lisogênico em bacteriófagos.



Fonte: adaptada de Lopes; Ho ([s.d.], p. 159).



Refleta

Se um vírus realiza o ciclo lisogênico e a célula hospedeira sofre divisão celular, ela continua sendo portadora do DNA viral?

Além dos vírus, existem alguns agentes semelhantes que merecem nossa atenção pela sua capacidade de causar doenças, em bactérias, animais e vegetais. São eles os **prions** e os **viróides**.

Os prions são partículas proteicas infecciosas extremamente pequenas. Eles não possuem ácido nucleico e mesmo assim são capazes de causar inúmeras doenças a seres humanos e outros mamíferos. Eles são resistentes à inativação pelo calor à 90 °C, que inativa os vírus e também aos tratamentos com radiação, que danificam os vírus, além de serem resistentes também às enzimas que digerem DNA ou RNA. Por esse motivo, atualmente, o desafio dos pesquisadores é conhecer mais sobre esses agentes e determinar como uma doença causada por prions se disseminam (BLACK, 2016).

Já os viróides são agentes infecciosos menores e mais simples que os vírus, consistindo em uma única molécula de RNA circular. Ao contrário dos vírus de RNA, que podem ser copiados no núcleo ou no citoplasma da célula hospedeira, eles são sempre copiados no núcleo dessa célula (BLACK, 2016). Outra diferença entre vírus e viróides é que os vírus podem afetar bactérias, animais e vegetais, já os viróides têm como hospedeiro apenas os vegetais – motivo pelo qual você ainda ouvirá falar muito sobre eles, pois são importantes fitopatógenos, causando doenças em batata, tomateiro e plantas ornamentais, por exemplo.



Assimile

Você se lembra o que são fitopatógenos?

O termo está relacionado ao conceito de patogenicidade, que é a capacidade de um determinado organismo causar doença em outro. No caso dos fitopatógenos, eles são em sua maioria microrganismos, capazes de causar doenças às plantas beneficiando o seu próprio metabolismo e crescimento. Além dos vírus, alguns fungos e bactérias estudados anteriormente também podem se comportar dessa maneira.

Por falar em fitopatógenos, vamos conhecer um pouco mais sobre as características das doenças causadas por vírus e viróides nas plantas?

A virologia vegetal é uma das áreas de pesquisa mais dinâmicas dentro da microbiologia e da fitopatologia, uma vez que novos vírus de plantas e mecanismos de patogênese são identificados a cada dia (TRIGIANO et al., 2010).

Os vírus fitopatogênicos não possuem habilidade de penetrar a cutícula, a epiderme ou a parede celular da planta. Para isso, na natureza, os vírus dependem de vetores capazes de romper essas defesas e permitir sua entrada nas células vivas. Esses vetores podem ser insetos, ácaros, nematoides, fungos ou plantas parasíticas (TRIGIANO et al., 2010).



Exemplificando

Os tripses são exemplos de insetos minúsculos que podem causar danos na agricultura, sendo pragas de diversas culturas. Na cultura do tomate, por exemplo, eles atuam como vetores dos *tospovírus*, que causam uma doença chamada vira-cabeça do tomateiro.

O que desperta interesse agrícola nos vírus fitopatogênicos é justamente a infecção e os sintomas que são capazes de causar nas plantas. Segundo Trigiano et al. (2010), as doenças virais podem ser facilmente confundidas com outras doenças e condições, como deficiências nutricionais, anormalidades genéticas e danos por agrotóxicos, por exemplo. Nesse sentido, a sintomatologia que estudaremos aqui irá lhe fornecer fortes indicações sobre uma possível infecção viral, mas esse não deverá ser o único embasamento para a diagnose, sendo necessário análises laboratoriais para identificação do agente causal.

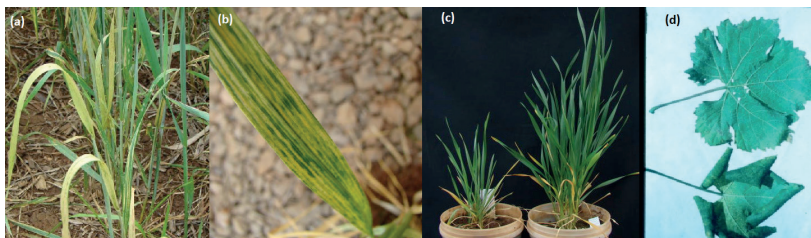
Os sintomas de infecção viral poderão apresentar-se somente em um local ou de forma sistemática, podem realizar alterações na clorofila ou em outros pigmentos da planta, podem causar anormalidades de crescimento ou, ainda, afetar a reprodução vegetal, diminuindo a produtividade ou tornando a planta estéril – perdendo sua habilidade de produzir sementes viáveis.

As **lesões locais** ocorrem quando a infecção do vírus não consegue se disseminar sistematicamente devido à resposta do hospedeiro.

Essas não são preocupantes pois os danos à planta são limitados. Já os **mosaicos e manchas difusas** (Figura 2.23a) são alterações no padrão de pigmentação, podendo variar do verde-pálido ao amarelo ou branco, causados pelo decréscimo da clorofila. Outro tipo de variação na pigmentação é quando o mosaico ocorre em monocotiledôneas, formando as listras e estrias (Figura 2.23b), características de doenças virais, onde há o surgimento de marcas longitudinais na folha que podem se estender por todo o seu comprimento.

Os vírus podem ainda causar anormalidades no crescimento da planta, causando o que chamamos de **nanismo** (Figura 2.23c). O nanismo é a redução do tamanho da planta hospedeira infectada, sendo um dos sintomas mais acentuados resultantes de uma infecção viral. Alterações na lâmina das folhas, chamadas de **distorção** (Figura 2.23d), também pode ser um sintoma de vírus que ocasionam bolhas, ondulações, rugosidades ou enrolamento.

Figura 2.23 | Sintomas encontrados em plantas infectadas por vírus. (a) Mosaico comum do trigo; (b) Mosaico estriado em milho; (c) Nanismo amarelo em trigo; (d) Enrolamento da folha em vinífera



Fonte: (a) <<https://goo.gl/nzbLEx>>; (b) <<https://goo.gl/wXwkuR>>; (c) <<https://goo.gl/W1QtNJ>>; (d) <<https://goo.gl/bfpyRU>>. Acesso em: 4 maio 2018.

Assim como as bactérias, os fungos podem também trazer benefícios à agricultura, o mesmo acontece com os vírus. Em virtude da especificidade desses agentes, a biotecnologia conseguiu identificar e produzir em laboratório algumas espécies capazes de infectar insetos e, assim, realizar o controle de pragas na agricultura. Podemos citar como exemplo o *Baculovirus anticarsia*, utilizado no controle da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatilis*), o *Baculovirus spodoptera*, que realiza o controle da lagarta do cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda*) e ainda o vírus *Granulose*, que controla o mandarová da mandioca (*Erinnyis ello*). Esses agentes são multiplicados em biofábricas e aplicados no campo via pulverização, assim como os inseticidas e demais agentes de controle microbiano, como bactérias e fungos.

Assim, chegamos ao final de mais uma unidade de ensino. Você conheceu um pouco mais sobre as características e modo de vida dos principais microrganismos de importância agrícola, tanto pelo nível de dano econômico que podem causar às lavouras quanto pelo benefício que eles podem nos trazer. O conhecimento de cada grupo de microrganismos bem como suas características é de grande importância para a identificação e controle de possíveis doenças, além de proporcionar a sua correta utilização em benefício do aumento de produtividade e controle de pragas e doenças no campo.

Sem medo de errar

Você conheceu nessa unidade importantes agentes infecciosos, microscópicos, chamados vírus. Vimos sua definição, suas características, replicação e você entendeu o motivo pelo qual não podemos chamar esses agentes de seres vivos, não é mesmo? Vamos agora resolver o problema em que você se encontra em sua rotina profissional?

Lembre-se que você foi contratado como especialista em microbiologia para cuidar das doenças de um pomar de citros, evitando a diminuição da produtividade bem como assegurando a manutenção da aparência sadia das laranjas, tangerinas e lima ácida que vão para a mesa.

Em um dia rotineiro de campo você observa que algumas laranjeiras apresentavam lesões arredondadas, lisas e de coloração verde clara e amarelada, tanto em sua face superior quanto inferior. Além disso, alguns frutos estavam apresentando lesões rasas e necróticas em sua superfície. Essas lesões escuras possuíam um halo amarelo, diferente da pinta preta já identificada há alguns dias atrás. Sua análise em lupa identifica o ácaro *Brevipalpus phoenicis* e logo você imagina que os sintomas possam se tratar de leprose dos citros, doença causada por vírus e transmitida pelo ácaro encontrado. **Vamos informar ao produtor que mais uma doença atacou o seu pomar? Como você irá descrever o tipo de agente causal da doença? Como eles se replicam? E como explicar a relação entre o ácaro e o vírus?**

Inicie explicando ao produtor que os vírus são agentes infecciosos muito pequenos inclusive para serem visualizados em um

microscópio óptico, pois são menores e mais simples que as células dos animais, dos vegetais e das bactérias. Eles são seres acelulares e diferem-se dos seres vivos por não possuírem metabolismo próprio, dependendo da estrutura e funcionamento de uma célula para sua replicação, motivo pelo qual não podemos chamá-los de seres vivos, sendo chamados de parasitas intracelulares obrigatórios.

Um vírus tipicamente possui um DNA ou RNA e um revestimento de proteínas, chamado capsídeo. Ele pode ainda possuir uma membrana chamada envelope. Uma partícula viral completa, com ácido nucleico, capsídeo e envelope é chamada de vírion. Para alguns gêneros, o vírion pode constituir-se apenas de nucleocapsídeo, não sendo necessário envelope.

Explique ainda os vírus que podem infectar diferentes tipos de organismos vivos, e se multiplicam por um processo chamado replicação viral, que consiste na utilização da célula hospedeira para produção de novas partículas virais. O ciclo se inicia quando o vírus se adere à célula hospedeira. Posteriormente, há a penetração e injeção de seu DNA em seu interior. A partir desse momento, com o seu material genético no interior da célula, o vírus passa a direcionar a síntese de seus componentes e sua organização, formando os vírions. Por fim, há a liberação das partículas virais. Nessa última etapa a célula hospedeira se rompe e novos vírions são liberados.

Por fim, explique que os vírus não possuem habilidade de penetrar nas células vegetais e, nesse sentido eles sozinhos não conseguem causar doenças às plantas. Para isso, na natureza, eles dependem de vetores capazes de romper as defesas das plantas e permitir sua entrada nas células vivas. Esses vetores podem ser insetos, ácaros, nematoides, fungos ou plantas parasíticas. No caso da leprose dos citros os vírus penetram nos frutos por meio do ácaro que você identificou.

Agora, além de formalizar com o produtor sobre esse novo agente infeccioso em seu pomar, não se esqueça de organizar o relatório de suas visitas com todas as orientações do mês que se passou. Mãos à obra!

Uma Biofábrica

Descrição da situação-problema

Você foi contratado como responsável técnico de uma biofábrica que produz agentes de controle microbiano de insetos. A empresa já atua na produção de fungos e bactérias entomopatogênicas para pragas da cana-de-açúcar e da soja, mas deseja expandir seu mercado. Assim, pretende iniciar a produção de vírus, pensando em aumentar sua cartela de produtos para soja e ainda ganhar o mercado de milho, que é forte na região onde está localizada. Qual seria sua orientação nesse caso? Você poderia sugerir algum vírus entomopatogênico?

Resolução da situação-problema

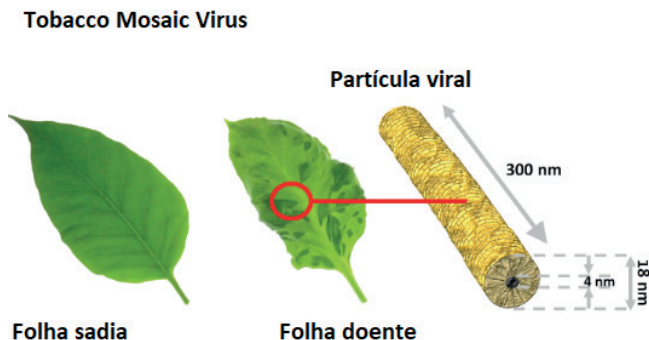
Como responsável técnico da biofábrica você poderia sugerir a produção de vírus entomopatogênicos, como o *Baculovirus*, por exemplo. Com essa nova produção, a empresa que já fornece agentes de controle para cana-de-açúcar e soja, poderá aumentar sua cartela de produtos e atingir novos mercados, atendendo a demanda de controle da lagarta do cartucho do milho com o *Baculovirus spodoptera* e ainda oferecer uma outra opção para controle da lagarta da soja, com o vírus *Baculovirus anticarsia*.

Faça valer a pena

1. O Mosaico do Tabaco é uma doença viral que acomete plantações de fumo. A planta infectada não morre, mas o vírus pode causar sua atrofia, retardando seu crescimento. Ela apresenta como sintomas folhas de coloração verde-clara entre as nervuras.

Veja a seguir os sintomas do Tobacco Mosaic Virus (TMV) bem como a representação da partícula viral:

Figura 2.24 | Vírus do Mosaico do Tabaco



Fonte: adaptada de Koch et al. (2016).

Analisando a Figura 2.24, pode-se classificar a forma da partícula viral de TMV como:

- a) Helicoidal.
- b) Bastonete.
- c) Poliédrico.
- d) Complexo.
- e) Icosaédrico

2. Um vírus tipicamente possui um DNA ou RNA e um revestimento de proteínas, chamado capsídeo. Ele pode ainda possuir uma membrana chamada envelope. Uma partícula viral completa, com ácido nucleico, capsídeo e envelope é chamada de vírion. Para alguns gêneros, o vírion pode constituir-se apenas de nucleocapsídeo, não sendo necessário envelope.

Um vírion adquire seu envelope durante a replicação viral na fase:

- a) Penetração.
- b) Biossíntese.
- c) Liberação.
- d) Adesão.
- e) Maturação.

- 3.** Analise as asserções a seguir sobre as diferenças entre vírus e células:
- I. Pode-se dizer que os vírus se diferem das células no fato de que as células contêm apenas RNA, enquanto as partículas virais possuem dois tipos de ácido nucleico, sendo o DNA juntamente com RNA.
 - II. As células crescem e se dividem, diferentemente dos vírus que não possuem metabolismo próprio, dependendo da estrutura e funcionamento de uma célula para sua replicação.

Após a análise das asserções, assinale a alternativa correta:

- a) As asserções I e II estão corretas.
- b) A asserção I é correta e a II é falsa, pois os vírus possuem proteínas responsáveis por seu metabolismo próprio.
- c) A asserção II é correta e a I é falsa, pois as bactérias possuem DNA e RNA enquanto os vírus possuem apenas um tipo de ácido nucleico.
- d) As asserções I e II são falsas, pois se tratam de características dos fungos.
- e) A asserção I é correta e a II é falsa pois as células não possuem metabolismo próprio.

Referências

- ABDELNOOR, R. V.; MARCELINO, F. C.; NEPOMUCENO, A. L. **Ferrugem asiática da soja**. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/soja/arvore/CONT000gclrznk02wx5ok0rofsmq5epf6ux.html>>. Acesso em: 4 jul. 2018.
- ALMEIDA, I.M.G. **Importância de bactérias fitopatogênicas em plantas ornamentais e seu controle**. XIV Reunião Intinerante de fitossanidade do Instituto Biológico. Pariqueraçu: 2006. Disponível em: <<http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/files/rifib/XIVRifib/almeida.PDF>>. Acesso em: 10 abr. 2018.
- BLACK, J.G. **Microbiologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.
- COUTINHO, L. N. **Aspectos de fungos fitopatogênicos em plantas ornamentais e seu controle**. XIV Reunião Intinerante de fitossanidade do Instituto Biológico. Pariqueraçu: 2006. Disponível em: <<http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/files/rifib/XIVRifib/coutinho.PDF>>. Acesso em: 23 abr. 2018.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Fungos e bactérias fazem plantas crescerem mais**. 2016. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/12132485/fungos-e-bacterias-fazem-plantas-crescerem-mais>>. Acesso em: 11 abr. 2017.
- EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Raven: Biologia Vegetal**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.
- GOMES, G. **Fitopatologia**. Técnico em Agricultura. Instituto Formação, 2013. Disponível em: <<http://www.ifcursos.com.br/sistema/admin/arquivos/14-39-41-apostilafitopatologia.pdf>>. Acesso em: 24 maio 2018.
- KOCH, et al. Novel roles for well-known players: from tobacco mosaic virus pests to enzymatically active assemblies. **Beilstein Journal of nanotechnology**. 2016, 7, 613–629. Disponível em: <<https://www.beilstein-journals.org/bjnano/content/pdf/2190-4286-7-54.pdf>>. Acesso em: 5 maio 2018.
- LOPES, S. G. B. C.; HO, F. F. C. **Vírus: Tópico 9**. Universidade de São Paulo. Disponível em: <<http://www.ficms.com.br/web/biblioteca/BIOLOGIA/LOPES%20E%20HO%20-%20USP%20-%209%20V%EDrus.pdf>>. Acesso em: 3 maio 2018.
- SCALOPPI. **Mancha preta dos citros: técnicas de manejo e queda precoce de frutos**. Disponível em: <<http://www.fcav.unesp.br/download/pgtrabs/pv/d/2412.pdf>>. Acesso em: 25 abr. 2018.
- SILVA, R. R.; COELHO, G. D. **Fungos: principais grupos e aplicações biotecnológicas**. São Paulo: Jardim Botânico de São Paulo, Instituto de Botânica, 2006. Disponível em: <http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/pdf/Fungos_Ricardo_Silva_e_Glauciane_Coelho.pdf>. Acesso em: 22 abr. 2018.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TRIGIANO, R. N.; WINDHAM, M. T.; WINDMAN, A. S. **Fitopatologia**: conceitos e exercícios de laboratório. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

VIEIRA, D. A. P.; FERNANDES, N. C. A. Q. **Microbiologia Geral**. Inhumas: Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia. 2012.

Microbiologia e bioquímica do solo

Convite ao estudo

Olá aluno! Estamos iniciando mais uma unidade de ensino dentro da Microbiologia Agrícola! Você estudou no começo da disciplina que a microbiologia do solo é um dos ramos dentro da microbiologia que estuda os micro-organismos que vivem neste ambiente, bem como suas atividades e a influência delas sobre as propriedades do solo, tanto no meio ambiente natural quanto em áreas agrícolas.

Assim, nesta unidade 3, você irá conhecer a microbiota e a bioquímica do solo, sendo capaz de analisar os impactos negativos do manejo agrícola a elas. Esse conhecimento será importante para que você possa trabalhar sempre pensando em causar o menor impacto a esse ecossistema, mantendo-o em equilíbrio. Vamos descobrir como?

A partir de agora você será o engenheiro agrônomo contratado por um pequeno produtor rural que vem cultivando milho por 5 anos consecutivos em uma área que havia sido destinada anteriormente apenas para pastagens.

O produtor que lhe contratou afirmou que a área não estava produtiva e que as plantas estavam se desenvolvendo lentamente, com poucas e pequenas espigas. Ele relatou ainda que desde que adquiriu a fazenda, há cerca de oito anos, jamais realizou análise de solo nem mesmo correção, apenas realiza a adubação para plantio indicada pelos vizinhos.

Além de coletar uma amostra de solo e solicitar uma análise, você orienta o produtor a não manter uma única cultura por anos consecutivos, e sugere que iniciem um trabalho com

a técnica de rotação de culturas, uma vez que a troca das espécies vegetais plantadas a cada ciclo permite a ciclagem de nutrientes, conservação do solo e, conseqüentemente, diminui as chances de exaustão do terreno. Durante sua consultoria, você deverá identificar os efeitos do manejo agrícola realizado pelo produtor sobre a microbiota do solo, procurando restaurar o equilíbrio ambiental dos processos bioquímicos e diminuir a necessidade de adubação constante. Você sabe quais são os aspectos que podem influenciar na microbiota do solo? Qual a relação entre essa microbiota, a fertilidade do solo e a produtividade agrícola? E como as práticas de manejo agrícola podem desequilibrar esse ecossistema?

Está pronto para mais esse desafio? Para lhe auxiliar, nesta unidade você conhecerá os fatores ambientais que afetam os microrganismos, o metabolismo e os processos microbianos do solo, além do impacto do manejo agrícola na microbiota do solo. Pronto para começar?

Seção 3.1

Fatores ambientais que afetam os microrganismos

Diálogo aberto

Na primeira unidade de ensino dessa disciplina você entendeu que os microrganismos que habitam o solo realizam um importante papel para manutenção e sobrevivência dos ecossistemas na Terra, não é mesmo? São esses os seres microscópicos responsáveis pela decomposição da matéria orgânica e a ciclagem de nutrientes, além da fixação de nitrogênio atmosférico e a decomposição de compostos químicos como herbicidas e óleo, proporcionando que o solo tenha condições ideais para manter a biodiversidade sempre elevada.

Mas você sabe quais são as melhores condições ambientais para que bactérias e fungos benéficos se desenvolvam no solo? Essa é uma informação de grande importância para nossas atividades diárias, pois um bom manejo agrícola deve respeitar as características biológicas e bioquímicas do solo, a fim de mantê-lo conservado e proporcionando uma boa produtividade agrícola, sem prejudicar o equilíbrio do ecossistema.

Na prática entenderemos a aplicação desse conhecimento em seu novo contexto profissional, onde você foi contratado para identificar os efeitos do manejo agrícola realizado pelo pequeno produtor de milho sobre a microbiota do solo, que já estava improdutivo.

Após solicitar e receber o resultado das análises de solo, você nota o pH do solo em 4,5, considerado muito ácido para uma boa absorção de nutrientes e aproveitamento da planta. Além disso, você havia combinado com o produtor que, nessa safra, vocês plantariam soja visando a rotação de culturas e também a fixação biológica de nitrogênio no solo, proporcionada pelas micorrizas, que são as associações simbióticas mutualistas entre alguns fungos do solo e a raiz dessas plantas.

Agora, com a informação sobre a acidez do solo, algumas dúvidas surgem: esse pH poderá afetar o desenvolvimento das micorrizas? Qual seria o pH ideal para os microrganismos no solo? Bactérias e fungos se desenvolvem bem no mesmo pH?

Para ser capaz de responder perguntas como essas, nessa seção você estudará os fatores que afetam o desenvolvimento dos microrganismos no solo e, dentre eles, verá qual a influência do pH, bem como da umidade, temperatura, radiação e da cobertura vegetal, por exemplo. Vamos lá!

Não pode faltar

O solo abriga grande parte dos microrganismos de interesse agrícola, sendo o reservatório da maioria deles. É no solo que bactérias e fungos, juntamente com outros seres vivos micro e macroscópicos, realizam suas funções biológicas contribuindo para as atividades biológicas do ambiente. De acordo com Leite e Araújo (2007) essa atividade é concentrada nas camadas iniciais do solo, entre 1 cm a 30 cm.

No começo dessa disciplina vimos que os microrganismos realizam funções de grande importância para o funcionamento do sistema solo e para equilíbrio dos ecossistemas, como a decomposição da matéria orgânica, a disponibilização de nutrientes para as plantas, a degradação de substâncias tóxicas, o controle biológico de pragas e patógenos, entre outros.

A microbiologia agrícola, juntamente com a ecologia microbiana, estudará as inter-relações dos microrganismos com o seu ambiente e com as práticas agrícolas, entendendo como os fatores bióticos e abióticos interferem no ecossistema. Aqui, nesta seção, estudaremos especialmente quais são os fatores abióticos (disponibilidade de nutrientes, umidade, pH, temperatura, radiação solar, entre outros) que interferem na atividade microbiana, seja no solo ou fora dele. Isso nos auxiliará a tomar boas decisões em relação às práticas agrícolas no campo, tanto para controlar aqueles microrganismos indesejados quanto para manter em equilíbrio aqueles que são essenciais para nós ou que nos trazem quaisquer benefícios.

Disponibilidade de nutrientes

Conforme já exposto antes, o solo é um reservatório natural de microrganismos e há um motivo para isso. Ele é também um reservatório de nutrientes essenciais para os microrganismos, possuindo diferentes elementos minerais, importantes para reações

metabólicas microbianas. Dentre esses elementos, podemos citar aqueles que fazem parte dos ciclos biogeoquímicos, estudados brevemente na Unidade 1. São eles: carbono (C), hidrogênio (H), oxigênio (O), nitrogênio (N), fósforo (P) e enxofre (S).

De acordo com Moreira e Siqueira (2006), esses elementos são responsáveis por processos como a síntese de enzimas, estrutura do DNA e do RNA, a estabilização da parede celular, a divisão celular e a mobilidade dos microrganismos, por exemplo. Assim, podemos dizer que a correta adição de nutrientes minerais, via adubação, pode favorecer o desenvolvimento e a atividade microbiana no solo enquanto que a baixa nutrição do solo, com a redução de matéria orgânica, pode afetar a sua diversidade microbiana.

Com o desenvolvimento da atividade microbiana no solo, tem-se também uma maior decomposição de substratos orgânicos e ciclagem de nutrientes, entretanto, a velocidade de decomposição desses substratos dependerá da complexidade de sua cadeia carbônica. Os substratos ricos em lignina (complexa cadeia de carbonos) serão mais resistentes que aqueles que contêm proteínas e glicose (que são cadeias simples de carbono), e serão decompostos mais rapidamente. Isso significa que o conhecimento sobre a biomassa microbiana e a composição química dos vegetais também deve ser considerado na definição das culturas a serem adotadas, uma vez que poderá influenciar diretamente do processo de sua decomposição (LEITE; ARAÚJO, 2007).



Exemplificando

As leguminosas, como soja e feijão, são geralmente escolhidas para aumento da disponibilidade de nutrientes no solo por possuírem maiores teores de nitrogênio e menores teores de cadeias complexas de carbono em relação à espécies não-leguminosas (LEITE; ARAÚJO, 2007). Isso permite que tenham uma mineralização mais rápida após a colheita ou em casos de plantio direto, quando a massa vegetal é incorporada ao solo.

Mas será que todos os microrganismos realizam a decomposição da matéria orgânica da mesma maneira? Quando comparamos fungos e bactérias, os fungos realizam a decomposição da lignina de maneira mais rápida que as bactérias, por possuírem enzimas

mais adaptadas a ela. As bactérias, em contrapartida, realizam a decomposição de substratos contendo celulose, glicose e proteína mais rapidamente.

Umidade

Outro fator essencial para a manutenção da vida no solo (e no planeta de maneira geral) é a água. Além de ser o principal solvente da natureza, na água encontramos diluídos muitos nutrientes, e também por meio dela que as principais reações bioquímicas acontecem no interior das células.

Mensuramos a quantidade de água no solo por meio da umidade nele contida, que é a massa de água contida em uma amostra de solo dividida pela massa de solo seco. Ela pode ser encontrada nos solos aderida às suas partículas (chamada água higroscópica) nos reservatórios contidos nos microporos (água capilar) ou ainda escoando pelos macroporos dos solos (água livre ou água gravitacional) (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A análise da umidade do solo é importante para os microrganismos, pois ela está diretamente ligada à sua atividade biológica, participando na difusão de nutrientes, auxiliando na motilidade microbiana e também na manutenção da temperatura e da aeração, que são outros dois fatores importantes. De acordo com Moreira e Siqueira (2006), as variações de temperatura e umidade estão relacionadas à ocorrência de períodos de seca/umidade, ou até mesmo congelamento/aquecimento, que auxiliam na liberação de matéria orgânica das superfícies, estimulando a atividade metabólica dos microrganismos do solo.

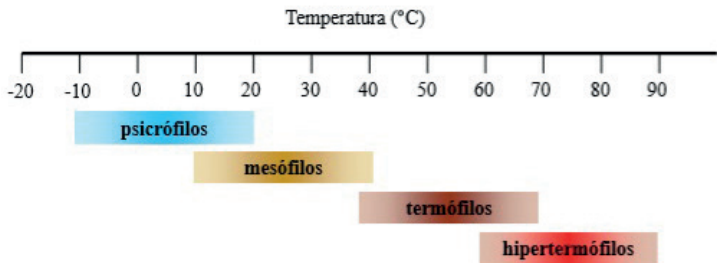
Além disso, ao contrário de organismos maiores, que possuem revestimentos protetores e ambientes internos líquidos, grande parte da microbiota do solo é composta por organismos unicelulares que são expostos diretamente aos seus meios e sofrem influência da umidade, sobrevivendo apenas algumas horas sem ela. Apenas esporos de organismos formadores de esporos, como fungos podem sobreviver em um estado inativo em um ambiente seco. Em contrapartida, quando em um ambiente com condições de umidade favorável, os esporos se desenvolverão normalmente, crescendo e se reproduzindo.

Temperatura

Assim como já mencionado, a temperatura também é um fator determinante para a atividade dos microrganismos do solo, pois afeta diretamente a sua fisiologia. Além disso, a temperatura influencia indiretamente no ciclo dos nutrientes e nas reações químicas possibilitadas pela água.

Para cada microrganismo existem temperaturas mínima, máxima e ótima, que é onde ele desenvolve suas atividades metabólicas com o maior aproveitamento possível. De acordo com sua temperatura ótima de atividade e crescimento, os microrganismos podem ser classificados em **psicrófilos**, sendo aqueles que possuem temperatura ótima menor que 20 °C; **mesófilos**, aqueles que possuem temperatura ótima entre 20 °C e 40 °C; ou **termófilos**, que por sua vez, possuem temperatura ótima maior que 40 °C. Os **hipertermófilos**, por sua vez, se desenvolverão em temperaturas a partir de 60 °C (Figura 3.1).

Figura 3.1 | Classificação dos microrganismos do solo de acordo com a sua temperatura ótima



Fonte: Cardoso e Andreote (2016, p. 27).

Além da resistência aos aumentos de temperatura, alguns organismos podem também apresentar-se resistentes a temperaturas extremamente baixas. Esses são os seres **psicrodúricos**, que não estão presentes na Figura 3.1. Eles sobrevivem em ambientes frios e se mantêm numa temperatura de congelamento.

Além de influenciar diretamente os organismos, a temperatura influencia também nas características físicas e químicas do solo como sua densidade, pressão e pH, por exemplo. As alterações dos padrões

físico-químicos do solo em função da temperatura podem também alterar o ambiente microbiano, e também a velocidade de degradação da matéria orgânica, por exemplo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

pH

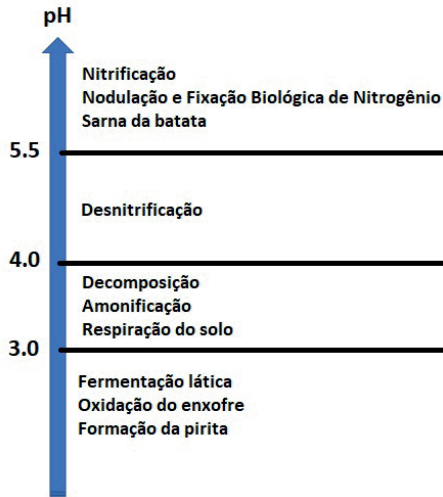
Outro importante fator determinante para a atividade e distribuição dos microrganismos é o pH (potencial hidrogeniônico). Ele consiste em um indicador sobre a acidez, neutralidade ou alcalinidade de um meio qualquer, que em nosso caso, será o solo. Apesar de hoje o pH ser amplamente utilizado por diversas áreas da ciência, sua escala foi inicialmente inventada para definir os limites do crescimento dos microrganismos em diferentes meios (BLACK, 2016).

O pH de um solo dependerá de inúmeros fatores e processos, como sua composição, grau de adubação, matéria orgânica, umidade, entre outros. Assim como acontece com a temperatura, os microrganismos também possuem um pH ótimo para se desenvolver. Segundo Black (2016), o pH no qual eles crescem melhor está geralmente próximo da neutralidade, uma vez que a maioria dos microrganismos não cresce em um pH acima ou abaixo de seu ótimo.

Assim, de acordo com sua tolerância à acidez ou alcalinidade do meio em que se encontram, os microrganismos podem ser classificados em: **insensitivos** ou indiferentes, sendo aqueles que toleram uma grande faixa de pH; **neutrófilos**, aqueles que não toleram acidez ou alcalinidade, sobrevivendo em pH neutro; **acidófilos**, aqueles que crescem melhor em condições ácidas e, por fim, **basófilos**, sendo aqueles que crescem melhor em condições de alcalinidade. De acordo com Leite e Araújo (2007), os fungos geralmente são acidófilos, mais adaptados ao pH menor que 5,0, enquanto as bactérias são seres neutrófilos e basófilos, adaptados a valores de pH entre 6,0 e 8,0.

Além de influenciar diretamente na microbiota do solo, por conta do pH ótimo de cada microrganismo, esse índice influencia ainda na disponibilidade e toxicidade de nutrientes minerais como ferro, manganês e alumínio, por exemplo, prejudicando a microbiota do solo novamente. Por conta dessa interferência na microbiota, o pH influencia indiretamente nos processos microbiológicos e bioquímicos como a fixação biológica de nitrogênio, a decomposição e a respiração do solo, conforme a Figura 3.2.

Figura 3.2. | Valores de pH críticos para os processos microbiológicos e bioquímicos



Fonte: Cardoso e Andreote (2016, p. 27).

Atmosfera gasosa

Você sabia que o solo também possui uma atmosfera? Sim, chamamos de atmosfera do solo a porcentagem, a composição e ainda a disponibilização dos gases nos poros do solo, gases estes que serão utilizados pelo metabolismo microbiano – principalmente o oxigênio. De acordo com a concentração de oxigênio no solo, podemos caracterizá-lo como um ambiente aeróbio, microaeróbio ou anaeróbio.

Os **ambientes aeróbios**, como o próprio nome já diz, possuem alta concentração de oxigênio e propiciam a ocorrência de metabolismos oxidativos de seres eucariontes, como fungos e nematóides e de bactérias aeróbias. Já os **ambientes microaeróbios** são aqueles que possuem baixa concentração de oxigênio. Os organismos que vivem nesse tipo de ambiente são capazes de utilizar tanto o oxigênio quanto outros elementos, como as bactérias microaerófilas (que se desenvolvem melhor na presença de pouco oxigênio) e as anaeróbias facultativas (que mantêm seu metabolismo aeróbio na presença de oxigênio). Por fim, os **ambientes anaeróbicos** são caracterizados pela ausência total de oxigênio e neles, apenas sobrevivem organismos procaríotos, como as bactérias anaeróbias obrigatórias (CARDOSO; ANDREOTE, 2016; BLACK, 2016).



Assimile

Os solos alagados, como os manguezais ou aqueles em que ocorre o cultivo de arroz, são tipicamente ambientes anaeróbios. Entretanto, além desses, podemos observar condições de anaerobiose também em solos predominantemente aeróbios em virtude da intensa atividade respiratória dos organismos. Nessas condições, além da ausência de oxigênio, a atmosfera do solo possuirá predominantemente gás carbônico (CARDOSO; ANDREOTE, 2016).

Pressão hidrostática, pressão osmótica e salinidade

Chamamos de pressão hidrostática aquela pressão exercida pela água em determinado ambiente (alagados, lagos, rios e oceanos), ligada à sua profundidade (BLACK, 2016). Em ambientes aquáticos ou alagados, a pressão exercida pela água aumenta de forma linear conforme a profundidade, ficando maior que a pressão atmosférica. As bactérias que sobrevivem a esses ambientes de alta pressão, mas morrem quando colocadas à pressão atmosférica são chamadas de **barófilas**.

Já a pressão osmótica é aquela aplicada sobre a membrana das células em solução, permitindo com que a osmose seja realizada (permissão para entrada ou saída de água da célula). A salinidade está ligada à pressão osmótica, pois em ambientes salinos a perda de água das células pode inibir o crescimento celular e até mesmo causar a morte dos microrganismos. Em relação à pressão osmótica e à salinidade, os ambientes hipersalinos são geralmente limitantes para a maioria dos microrganismos, entretanto, existem bactérias chamadas **halófilas**, que precisam de quantidades de cloreto de sódio para sobreviverem; normalmente encontradas em oceanos ou solos hipersalinos. Também nesses ambientes podemos encontrar os organismos halodúricos, que suportam alta concentração de sal.



Reflita

Considerando a pressão osmótica e a salinidade, sabemos que a maioria dos microrganismos não são encontrados em ambientes ricos em sal. Podemos expandir nossos horizontes e utilizar essa lógica para a conservação dos alimentos? Alimentos com grandes concentrações de substâncias salinas (como carne de sol, bacalhau e conservas) podem inibir o crescimento bacteriano?

Radiação solar

Por fim, o último fator que estudaremos nessa seção é a radiação. As energias radiantes como os raios gama e a luz ultravioleta podem ocasionar alterações no DNA dos microrganismos (mutações) ou até mesmo matá-los. Alguns microrganismos possuem pigmentos que filtram a radiação e ajudam a prevenir danos ao seu DNA, porém a maioria deles pode ser agredida pelos raios do sol.

Solos descobertos podem perder biodiversidade microbiana em virtude da maior exposição ao sol. Além disso, microrganismos utilizados no controle biológico de pragas também podem ser afetados caso o horário da aplicação não seja respeitado. Para um melhor resultado do controle, as aplicações de fungos e bactérias devem ocorrer nos períodos com menor incidência de raios ultravioleta (como pela manhã ou final da tarde), ou ainda em dias nublados, por exemplo.

Assim, estamos chegando ao final da primeira seção dessa unidade. Iniciamos caracterizando o solo como um ambiente dinâmico, onde temos o desenvolvimento de uma comunidade viva composta por abundantes microrganismos além de outras formas de biodiversidade. Esse conhecimento nos leva a compreender que a biodiversidade do solo possui características físicas e químicas e nossas práticas de manejo agrícolas podem interferir negativamente nos processos naturais, levando a uma restrição na diversidade de vida do solo. Por outro lado, a partir do conhecimento dos fatores que influenciam a vida no solo, podemos trabalhar da melhor maneira possível, sem agredir o ecossistema e ainda de maneira a não prejudicar a produção vegetal. Continuamos esse assunto na próxima seção!



Pesquise mais

Quer conhecer mais sobre o sistema solo e a biodiversidade nele existente?

Utilizaremos como referência nessa Unidade 3 o livro de Cardoso e Andreote indicado abaixo. Para esse primeiro momento, não deixe de estudar o capítulo 1 (p. 9-18).

CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. 2. ed. Piracicaba: ESALQ, 2016. Disponível em: <<http://www.livrosabertos.sibi.usp.br/portaldelivrosUSP/catalog/book/109>>. Acesso em: 10 maio 2018.

Você já sabia que os microrganismos podem ser encontrados praticamente em quase todo o tipo de ambiente da Terra. Agora, você já sabe também que eles podem ser encontrados caso as condições sejam favoráveis ao seu metabolismo e atividades vitais. Vimos que as espécies de microrganismos em um determinado ambiente, bem como a velocidade com que eles crescem e se desenvolvem, podem ser influenciadas por fatores abióticos como pH, temperatura, umidade e radiação solar, por exemplo.

Nesse contexto, você foi contratado como agrônomo para identificar os efeitos do manejo agrícola realizado por um pequeno produtor de milho sobre a microbiota do solo, que já estava improdutivo. Após solicitar e receber o resultado das análises de solo, você notou o pH do solo em 4.5, considerado muito ácido para uma boa absorção de nutrientes e aproveitamento da planta. Além disso, você havia combinado com o produtor que, nessa safra, vocês plantariam soja visando a rotação de culturas e a fixação biológica de nitrogênio no solo, proporcionada pelas micorrizas, que são as associações simbióticas mutualistas entre alguns fungos do solo e a raiz dessas plantas.

Qual seria o pH ideal para os microrganismos no solo? Bactérias e fungos se desenvolvem bem no mesmo pH? Esse pH poderá afetar o desenvolvimento das micorrizas?

O pH (potencial hidrogeniônico) do solo consiste em um indicador sobre sua acidez ou alcalinidade. Ele é tão importante para o metabolismo do solo que sua escala foi inicialmente inventada para definir os limites do crescimento dos microrganismos em diferentes meios. Ele é influenciado por inúmeros fatores e processos como a composição do solo, o grau de adubação, de matéria orgânica e de umidade.

Os microrganismos possuem um pH ótimo para se desenvolverem, e está geralmente próximo da neutralidade (pH igual ou próximo de 7). Assim, de acordo com sua tolerância à acidez ou alcalinidade do meio em que se encontram, os microrganismos podem ser classificados em: **insensitivos** ou indiferentes, sendo aqueles que toleram uma grande faixa de pH; **neutrófilos**, sendo aqueles que não toleram acidez ou alcalinidade, sobrevivendo em pH neutro; **acidófilos**, aqueles que

crecem melhor em condições ácidas e, por fim, **basófilos**, aqueles que crescem melhor em condições de alcalinidade.

As bactérias são seres neutrófilos e basófilos, sendo mais adaptados a valores de pH entre 6.0 e 8.0; já os fungos geralmente são acidófilos, sendo mais adaptados ao pH próximo de 5.0. Nesse sentido, com o pH da área em que está analisando em 4.5, dificilmente as bactérias fixadoras de nitrogênio se adaptariam e as micorrizas seriam prejudicadas, já que a maioria dos microrganismos não cresce em um pH acima ou abaixo de seu ótimo.

Assim, é importante que você relate logo ao produtor rural que uma correção da acidez do solo será necessária para um bom resultado com o plantio da soja. Não deixe de explicar a ele que o pH influencia direta e indiretamente nos processos microbiológicos e bioquímicos do solo, como a fixação biológica de nitrogênio, a decomposição e a respiração do solo.

Avançando na prática

De quem é a culpa?

Descrição da situação-problema

Você foi contratado por um produtor de gado para auxiliá-lo no controle da cigarrinha (*Mahanarva posticata*) que estava atacando seu pasto e prejudicando a alimentação do rebanho. O produtor queixou-se que era verão e, nessa época do ano, ele não costumava realizar suplementação da alimentação, uma vez que apenas o pasto era suficiente para nutrir o gado. Entretanto, com o ataque da cigarrinha, o pasto está seco e sem vida.

O produtor relatou ainda que estava fazendo aplicações constantes do fungo *Metarhizium anisoliae*, mas que o controle era ineficiente. As aplicações estavam ocorrendo diariamente às 13h, independente das condições atmosféricas. Apenas o vento era considerado, visto que se realizava aplicação aérea.

E agora? O que pode estar dando errado com o controle da cigarrinha das pastagens nessa propriedade? Seria mesmo o controle biológico ineficiente? Quais seriam suas orientações para o produtor?

Resolução da situação-problema

Analisando o caso do produtor rural, você já sabe que os fungos são bons agentes de controle biológico de pragas e que o *Metarhizium anisopliae* é o fungo indicado para controle das cigarrinhas das raízes e da cana-de-açúcar, não é mesmo? Até aqui, tudo bem.

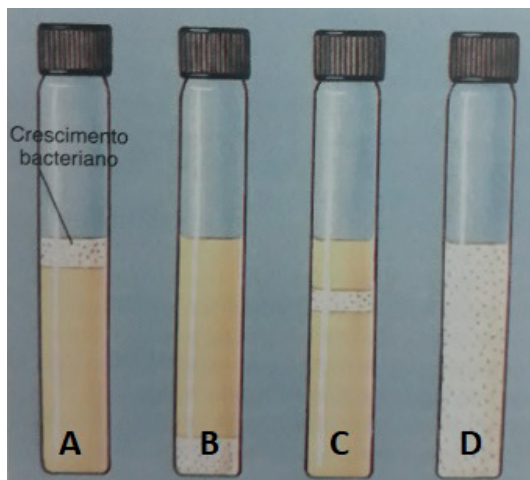
Um ponto importante para o controle biológico ser eficiente é a análise de condições como temperatura, umidade e também a radiação solar. Os raios gama e a luz ultravioleta podem ocasionar alterações no DNA dos microrganismos (mutações) ou até mesmo matá-los. Nesse sentido, os microrganismos utilizados no controle biológico de pragas podem ser afetados caso o horário da aplicação não seja respeitado. Às 13h geralmente há uma grande incidência de raios ultravioleta e, no caso do produtor, a pastagem não apresenta sombreamento e o microrganismo acaba ficando mais exposto, morrendo com facilidade. Para melhor resultado do controle, você deve orientar o produtor de que as aplicações de fungos e bactérias ocorram nos períodos com menor incidência de raios ultravioleta (como pela manhã ou final da tarde), ou ainda em dias nublados, por exemplo.

Faça valer a pena

1. De acordo com a concentração de oxigênio no solo, podemos caracterizá-lo como um ambiente aeróbio, microaeróbio ou anaeróbio. Nesses ambientes, podem viver seres aeróbios obrigatórios, seres microaerófilos, que se desenvolvem melhor na presença de pouco oxigênio, seres anaeróbios facultativos, que mantêm seu metabolismo aeróbio na presença de oxigênio e ainda seres anaeróbios obrigatórios, que não sobrevivem em presença de oxigênio.

Analise a Figura 3.3 a seguir:

Figura 3.3 | Padrões de uso do oxigênio



Fonte: adaptada de Black (2016, p. 139).

Agora relacione cada tudo de ensaio com o tipo de cultura bacteriana existente:

1. Aeróbia obrigatória.
2. Microaerófila.
3. Anaeróbia facultativa.
4. Anaeróbia obrigatória.

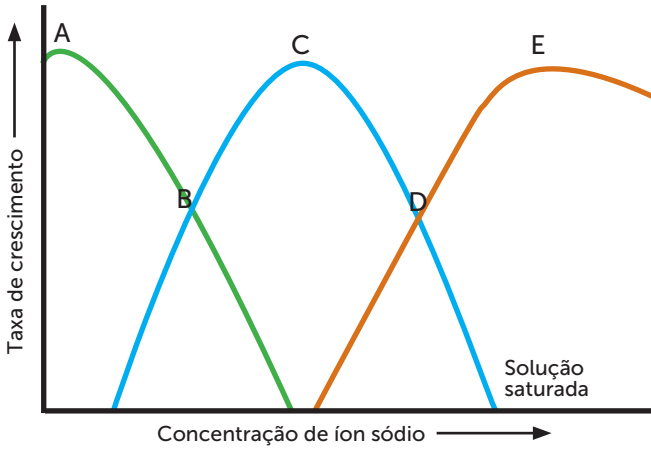
Agora assinale a alternativa que contém a assimilação correta entre as culturas bacterianas e os tubos de ensaio: A-1; B-4; C-2; D-3.

- a) A-2; B-4; C-1; D-3.
- b) A-1; B-3; C-2; D-4.
- c) A-3; B-2; C-4; D-1.
- d) A-1; B-2; C-3; D-4.

2. Em relação à pressão osmótica e salinidade, os ambientes hipersalinos são geralmente limitantes para a maioria dos microrganismos; entretanto existem bactérias chamadas **halófilas**, que gostam de sal e requerem quantidades de cloreto de sódio para sobreviverem; normalmente encontradas em oceanos ou solos hipersalinos.

Analise o gráfico a seguir:

Figura 3.4 | Taxas de crescimento dos organismos halófilos em diferentes meios



Fonte: adaptada de Back (2016, p. 141).

Pode-se dizer que as bactérias halófilas encontraram sua concentração ideal de íon sódio em:

- a) A.
- b) B.
- c) C.
- d) D.
- e) E.

3. A temperatura é um dos fatores determinantes para a atividade dos microrganismos do solo, pois afeta diretamente sua fisiologia. Além disso, a temperatura influencia indiretamente no ciclo dos nutrientes e na atividade da água. Para cada microrganismo existem temperaturas mínima, máxima e ótima, que é onde ele desenvolve suas atividades metabólicas com o maior aproveitamento possível.

De acordo com sua temperatura ótima de atividade e crescimento, os organismos que possuem temperatura ótima menor que 20 °C são chamados de:

- a) Mesófilos.
- b) Psicrófilos.
- c) Termófilos.
- d) Barófilos.
- e) Hipertermófilos.

Seção 3.2

Metabolismo e processos microbianos do solo

Diálogo aberto

Caro aluno! Você já sabe que o solo é de grande importância para a manutenção da vida na Terra e para a produção agrícola. Além disso, o que o faz ser importante nessa disciplina de Microbiologia Agrícola é que, além de ser depósito de matéria orgânica, ele também é um grande armazenador de biomassa microbiana, responsável pela qualidade ambiental e a vida no sistema terrestre por permitir a ciclagem de nutrientes.

Dessa forma, iniciamos agora o estudo do metabolismo e dos processos microbianos no solo para que, posteriormente, na próxima seção possamos compreender como o manejo agrícola pode influenciar na qualidade do solo, entendendo-o como um sistema vivo e dinâmico.

Para isso, vamos retomar seu novo trabalho. O produtor rural que lhe contratou vem enfrentando problemas com a produtividade de sua lavoura de milho e você já identificou que boa parte da responsabilidade disso pode ser o pH ácido do solo. Vocês agora decidiram corrigir essa acidez e realizar o plantio de soja, realizando a rotação de culturas para melhorar a qualidade e fertilidade do solo, entretanto, apenas essa prática não irá resolver todo o problema que você está verificando na área.

Além do pH, você percebeu pela análise de solo realizada, que a área ainda apresenta muitas limitações para o cultivo, como presença altíssima de alumínio, que é tóxico, e baixo teor de carbono e de matéria orgânica, que é a principal responsável pela fertilidade natural. Outro ponto importante é que você se lembrou que o produtor havia afirmado que durante anos consecutivos o solo foi preparado para a pastagem com utilização intensiva de grades e arados, e isso contribuiu para a diminuição dos microrganismos no solo, em virtude da exposição.

O produtor vem confiando no seu trabalho, mas ainda não entendeu por que a matéria orgânica está relacionada à fertilidade do

solo. E agora, agrônomo? **Como explicar para o produtor a relação entre o teor de carbono, a matéria orgânica do solo e sua fertilidade? Como essa situação poderá ser revertida na próxima safra?**

Para lhe auxiliar na resposta ao produtor, nesta seção você conhecerá um pouco mais sobre os processos microbianos do solo e como eles são responsáveis pela manutenção dos ecossistemas. Conhecerá ainda como acontece o fluxo de energia e dos elementos do solo para a planta, o que é a biomassa microbiana e quais são as enzimas presentes no solo, que auxiliam na decomposição da matéria orgânica e sua disponibilização para os vegetais.

Pronto para começar? Assim que estiver preparado, você deve responder ao produtor e ainda definir a próxima ação a ser tomada para recuperação da fertilidade da área.

Não pode faltar

Grande parte da vida na Terra só é possibilitada porque existem ciclos biogeoquímicos que permitem a ciclagem de água e nutrientes em nossa biosfera. Esses ciclos, por sua vez, são possibilitados por meio dos processos microbianos, que realizam a manutenção dos ecossistemas. Até aqui nada de novidade, pois já estudamos esse conteúdo na Unidade 1, quando conhecemos a importância do estudo da microbiologia, em especial da microbiologia agrícola.

Um dos elementos de maior importância para a manutenção da vida e também de maior abundância nas estruturas celulares é o carbono, motivo que faz dele o nosso foco nesse momento. O carbono é o elemento mais requisitado para a formação de novas células e ainda essencial para o crescimento e desenvolvimento de plantas, animais e microrganismos do solo.

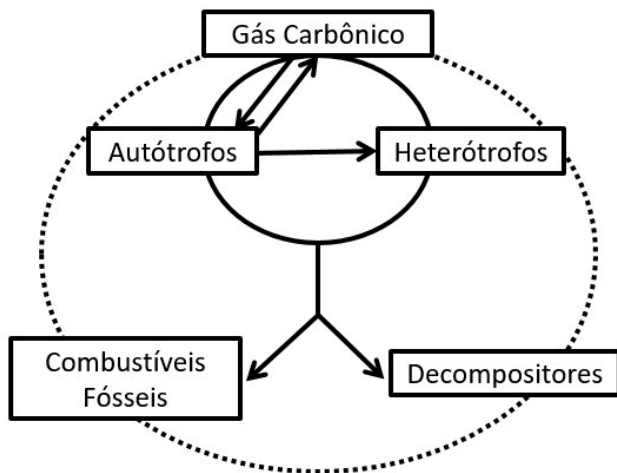
Na biosfera ele é encontrado nos combustíveis fósseis, na matéria orgânica em decomposição ou na forma de carbonatos dissolvidos nas águas oceânicas. Mas você sabe como o carbono da biosfera é assimilado pelos seres vivos?

Sua maior parcela utilizada no processo nutricional dos organismos ocorre, principalmente, sob a forma de carbono orgânico, sendo originado prioritariamente por meio da fotossíntese. O carbono fixado pela fotossíntese é assimilado pela planta e, posteriormente, incorporado à matéria orgânica do solo (MOS).



Vamos lembrar rapidamente como é o ciclo do carbono? Veja a Figura 3.5.

Figura 3.5 | Esquema resumido do Ciclo do Carbono



Fonte: elaborada pela autora.

Quando falamos em processos microbianos do solo, um dos conceitos que precisam ser claros é o de **matéria orgânica do solo (MOS)**. O termo MOS se refere a todos os compostos que contêm carbono orgânico em sua composição. Ao contrário do que muitos pensam, ele não inclui apenas tecidos vegetais e animais em decomposição, mas sim todos os organismos vivos ou mortos, os produtos da decomposição e ainda substâncias orgânicas microbiológicas (CARDOSO; ANDREOTE, 2016).

O carbono é importante nesse conceito pois, segundo Cardoso e Andreote (2016), ele constitui aproximadamente 58% da composição da MOS, que é de grande importância para os sistemas agrícolas e florestais, em virtude dos diversos benefícios produzidos para as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo. Essa última, em especial refere-se à utilização dos compostos orgânicos da MOS pelos organismos do solo, como fonte de energia e nutrientes para a realização dos processos de transformação do carbono. Podemos

citar como exemplos desses processos, a fixação do carbono atmosférico pelas plantas e a formação de substâncias húmicas pelas minhocas.

Outro conceito importante é o de **Biomassa Microbiana** (BM), que se trata da principal constituinte da MOS viva, excluindo-se as raízes e os animais maiores que $5 \times 10 \mu\text{m}$ (CARDOSO; ANDREOTE, 2016). A BM é composta por bactérias, fungos, nematoides e protozoários e, embora a quantidade de bactérias seja maior que a de fungos, estes últimos, por possuírem maior massa corpórea (em virtude do micélio), correspondem pela maior parte da biomassa microbiana do solo.

Ela é fundamental para que ocorra a decomposição dos resíduos e a estabilização dos agregados do solo. Além disso, representa uma fonte de nutrientes às culturas, desde que exista MOS morta no solo, uma vez que atua primordialmente como agente de decomposição dos resíduos do solo. Por falar em decomposição, o carbono proveniente dos resíduos orgânicos pode passar para formas mais estáveis no solo ou ser liberado para a atmosfera em forma de dióxido de carbono (CO_2).

Outro fato sobre a decomposição da matéria orgânica e do carbono nela existente é que, quando está associado à MOS, ele possui um menor tempo de ciclagem, sendo, segundo Cardoso e Andreote (2016) de 2,5 anos em regiões de clima temperado e três meses em regiões de clima tropical úmido. Há ainda uma tendência de que a biomassa microbiana seja maior nas camadas mais superficiais do solo, em virtude da maior disponibilidade de matéria orgânica, água e outros nutrientes.



Refleta

Se uma determinada propriedade possui alto pH no solo, baixa umidade e altas temperaturas, como se comportará a Biomassa Microbiana nesse ambiente? E a fertilidade do solo?

Assim, podemos concluir que a BM é diretamente relacionada à quantidade e composição da MOS e, conseqüentemente, à fertilidade do solo, uma vez que responde rapidamente ao manejo que aplicamos a ele e pode ser favorecida ou prejudicada em virtude de alteração nos fatores que estudamos na seção passada.

Um exemplo de como a biomassa microbiana pode ser favorecida é realizando o plantio no sistema de plantio direto, aquele em que não há revolvimento do solo pelo uso de grades e arados. Esse sistema possibilita o aumento da MOS, uma vez que o plantio da nova cultura é realizado sob a palha da cultura anterior, e consequentemente a biomassa microbiana é favorecida. Estes fatores, por sua vez favorecem o crescimento do vegetal, conforme você pode ver na Figura 3.6.

Figura 3.6 | Comparação do desenvolvimento de um vegetal em sistema de plantio convencional e sistema de plantio direto



Fonte: <<http://www.coamo.com.br/jornal/conteudo.php?ed=0&id=284>>. Acesso em: 28 maio 2018.

Fique tranquilo, pois esse assunto será explorado com maior profundidade na próxima seção. O importante aqui é que você esteja consciente que a microbiologia agrícola é importante também para qualquer área da Ciência do Solo, uma vez que, neste contexto, o nível de matéria orgânica do solo (que inclui os teores de carbono), os índices de biomassa microbiana e a atividade enzimática dos microrganismos vêm sendo cada dia mais utilizados como indicadores do metabolismo e da qualidade do solo. Segundo Cardoso e Andreote (2016), esse termo pode ser entendido como a capacidade do solo em manter sua produtividade, a qualidade ambiental do ecossistema e a vida vegetal e animal saudável no ecossistema terrestre.

Para entender um pouco mais sobre os processos microbianos do solo, precisamos compreender também como eles atendem suas demandas de carbono e outros nutrientes, compreendendo os mecanismos que eles utilizam para adquirir, utilizar e transferir a energia necessária para sua síntese de compostos orgânicos.

Basicamente a vida é sustentada na Terra por dois processos biológicos conhecidos: a fotossíntese e a decomposição. O primeiro é responsável por gerar energia celular, e o segundo por consumi-la, podendo ser comparadas à construção e à desconstrução de estruturas orgânicas. Esses dois processos ocorrem a todo tempo no ecossistema e envolvem complexas reações químicas. Entretanto, existem outros tipos de reações sendo realizadas a todo tempo pelos organismos vivos, sejam eles procariotos ou eucariotos, e à soma de todas essas reações químicas, chamamos de **metabolismo**.



Exemplificando

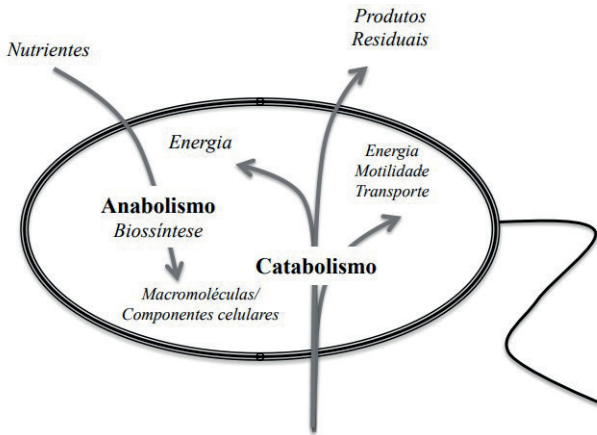
Em relação aos microrganismos e metabolismo do solo, é importante citar que existem algumas reações que são únicas de seres vivos procariotos. Alguns exemplos são a digestão completa de celulose, a degradação do petróleo, a fixação biológica do nitrogênio, o processo de desnitrificação e a respiração anaeróbica. Essas reações não são comumente realizadas por outros organismos (CARDOSO; ANDREOTE, 2016).

De acordo com a forma de uso da energia, podemos dividir, didaticamente, o metabolismo celular em duas classes de reações químicas: **catabólicas** ou **anabólicas** (Figura 3.2). As reações catabólicas ou degradativas são conhecidas como aquelas que produzem e liberam energia, sendo chamadas de reações exergônicas. Tratam-se de reações reguladas por enzimas que realizam a “quebra” dos compostos orgânicos complexos em compostos orgânicos mais simples. Em geral, utilizam água, sendo chamadas reações hidrolíticas, e um exemplo é a quebra de açúcares, como glicose e frutose, em dióxido de carbono e água.

As reações **anabólicas ou de biossíntese**, por sua vez, são aquelas que consomem energia, chamadas reações endergônicas, pois são reguladas por enzimas que a requerem. Essas reações estão vinculadas à construção de moléculas orgânicas complexas, utilizando-se de moléculas orgânicas mais simples. Elas podem liberar água (reações de síntese por desidratação), e um exemplo é a síntese de proteínas a partir de aminoácidos.

Vejam a comparação entre elas na Figura 3.7, que esquematiza uma bactéria e as reações que estão ocorrendo em seu interior.

Figura 3.7 | Diferenças entre tipos de metabolismo celular: anabolismo versus catabolismo

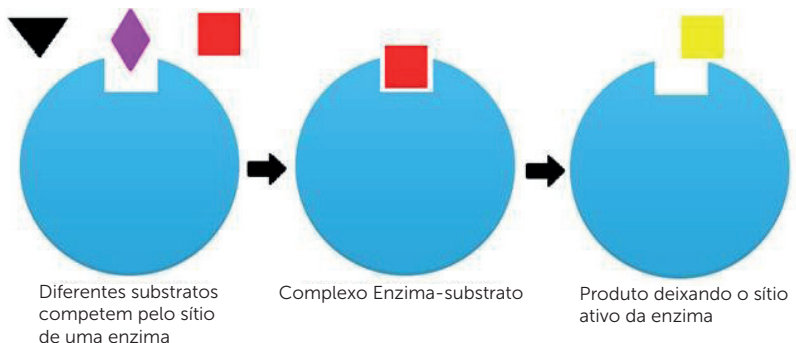


Fonte: Cardoso e Andreote (2016, p. 62).

As reações metabólicas de anabolismo e catabolismo envolvem também algumas proteínas, as quais chamamos de **enzimas**. As enzimas são determinadas por questões genéticas do organismo e determinam as vias metabólicas de uma célula, ou seja, a sequência de reações químicas que ocorrerão.

Elas são moléculas catalizadoras de reações, o que significa que são capazes de acelerar as reações químicas que ocorrem dentro das células, atuando em sua substância específica, chamada substrato. Quando uma enzima está acoplada a seu substrato chamamos de "complexo enzima-substrato" (Figura 3.8).

Figura 3.8. | Esquema representativo de uma reação metabólica utilizando enzima



Fonte: elaborada pela autora.

Mas você sabe por que as enzimas são importantes no contexto da microbiologia do solo?

De acordo com Cardoso e Andreote (2016), as enzimas têm participação especial nos ciclos dos elementos do solo, sendo primordiais para as transformações bioquímicas no sistema solo-planta. As enzimas mais estudadas estão ligadas aos ciclos da matéria orgânica no solo e dos macronutrientes carbono (C), nitrogênio (N), enxofre (S) e fósforo (P). Elas desempenham importantes papéis para a liberação de açúcares, que são fontes de energia imediata para os microrganismos, e realizam a hidrólise da celulose, além de indicar o estado metabólico da biomassa microbiana, em virtude de sua relação direta com a atividade de oxidação da MOS. São elas: β -glicosidase, a invertase, a galactosidase, as celulasas e as desidrogenases (CARDOSO; ANDREOTE, 2016). Além destas, outras enzimas envolvidas em reações do solo são as hidrolases e oxirredutases. Estas, por sua vez, controlam a decomposição da matéria orgânica e as transformações inorgânicas que ocorrem no solo.

Assim, as enzimas tornam-se essenciais para que os microrganismos possam agir nos ciclos biogeoquímicos, devolvendo elementos químicos para o solo e, conseqüentemente, nutrientes para as plantas. Como as enzimas são sintetizadas primordialmente pela microbiota do solo, é necessário que nos preocupemos em fornecer a ele todas as condições favoráveis para a atividade microbiana, respeitando os fatores estudados na seção passada.

Na próxima seção concluiremos esse assunto e conheceremos como cada prática de manejo agrícola pode interferir na MOS e, conseqüentemente, em sua qualidade. Você verá que práticas como adubação orgânica, manutenção de vegetação, plantio direto e rotação de culturas também favorecem a atividade enzimática, e se correlacionam positivamente com a produtividade agrícola e a qualidade do solo.



Pesquise mais

Gostou do assunto e quer conhecer um pouco mais sobre ele?

Leia o artigo indicado a seguir que trata da relação entre as atividades microbianas e as transformações no ciclo dos elementos do solo.

MACHADO, D. M. et al. Atividades Microbianas e as transformações dos elementos no solo. **Enciclopédia biosfera**. Goiânia: 2012. Disponível em: <<https://goo.gl/3h4s3Z>>. Acesso em: 28 maio 2018.

Sem medo de errar

Estamos chegando ao final de mais uma seção dessa unidade, em que estudamos um pouco mais sobre os processos microbianos do solo e como eles são responsáveis pela manutenção dos ecossistemas. Conhecemos a relação entre o carbono do solo, a matéria orgânica e a biomassa microbiana, entendendo como essa última atua no sentido de favorecer o fluxo de elementos químicos do solo para a planta. Agora você está pronto para seu novo desafio.

Lembre-se que o produtor rural que lhe contratou vem enfrentando problemas com a produtividade de sua lavoura de milho e você já identificou que boa parte da responsabilidade disso pode ser o pH ácido do solo. Vocês irão corrigir a acidez do solo e realizar o plantio de soja; entretanto, você já sabe que apenas essa prática não irá resolver todo o problema em verificação na área, pois além do pH, você percebeu que a área ainda apresenta altíssima quantidade de alumínio, que é tóxico para as plantas e baixo teor de carbono e de matéria orgânica, que é a principal responsável pela fertilidade natural. O produtor ainda não entendeu por que a matéria orgânica está relacionada à fertilidade do solo.

E agora, agrônomo? Como explicar para o produtor a relação entre o teor de carbono, a matéria orgânica do solo e sua fertilidade? Como essa situação poderá ser revertida na próxima safra?

Na análise de solo você percebeu que o teor de carbono e de matéria orgânica estava baixo, não é mesmo? O problema é que ele é um dos elementos de maior importância para a manutenção da vida, uma vez que é o elemento mais requisitado para a formação de novas células. A matéria orgânica, rica em carbono, é essencial para a nutrição de plantas, animais e microrganismos do solo. O carbono ocorre, principalmente, sob a forma de carbono orgânico, sendo originado prioritariamente por meio da fotossíntese, assimilado pela planta e posteriormente incorporado à matéria orgânica do solo (MOS).

A MOS, por sua vez, se refere a todos os compostos que contêm carbono orgânico em sua composição e não inclui apenas tecidos vegetais e animais em decomposição, mas sim todos os organismos vivos ou mortos, os produtos da decomposição e ainda substâncias orgânicas microbiológicas.

O carbono constitui aproximadamente 58% da composição da MOS, que é de grande importância para os sistemas agrícolas e florestais, em virtude dos diversos benefícios produzidos para as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo. Podemos citar como exemplos desses processos a fixação do carbono atmosférico pelas plantas e a formação de substâncias húmicas pelas minhocas.

A Biomassa Microbiana (BM) também está relacionada à MOS e ao teor de carbono, pois se trata da principal constituinte da MOS viva, excluindo-se as raízes e os animais maiores que $5 \times 10 \mu\text{m}$. Isso quer dizer que ela é composta por bactérias, fungos, nematoides e protozoários. Ela é fundamental para que ocorra a decomposição dos resíduos e a estabilização dos agregados do solo. Além disso, ela representa uma fonte de nutrientes às culturas, desde que exista MOS morta no solo, uma vez que ela atua primordialmente como agente de decomposição dos seus resíduos.

Assim, você pode concluir que a BM é diretamente relacionada à quantidade de MOS e, conseqüentemente, à fertilidade do solo, uma vez que responde rapidamente ao manejo que aplicamos a ele e pode ser favorecida ou prejudicada em virtude de alteração nos fatores que estudamos na seção passada.

Para que a biomassa microbiana possa ser favorecida, o agricultor pode realizar, por exemplo, o plantio no sistema de plantio direto, onde não há revolvimento do solo pelo uso de grades e arados. Esse sistema possibilitará o aumento da MOS, pois o plantio da nova cultura é realizado sob a palha da cultura anterior, e conseqüentemente, a biomassa microbiana é favorecida.

Não se esqueça que agora você deve responder o produtor e ainda definir a próxima ação a ser tomada para recuperação da fertilidade da área, que pode ser o plantio direto na palha, que possibilita o aumento da MOS, e também de carbono, da biomassa microbiana e da fertilidade do solo na próxima safra.

Evitando um grande erro

Descrição da situação-problema

Você é o agrônomo de uma propriedade que há alguns anos vem tentando cultivar cana-de-açúcar orgânica em uma área localizada com características de solo arenoso, no estado de Maceió. O produtor vem conseguindo manter a cigarrinha-das-folhas (*Mahanarva posticata*) abaixo do nível de dano econômico com a aplicação de fungos entomopatogênicos que são favorecidos pela umidade da região. Entretanto, mesmo com o rígido controle de pragas, a aplicação de torta de filtro na área e a realização de colheita mecanizada com a manutenção da palhada sob o solo, a produtividade ainda continua baixa. O produtor afirmou a você que o nível de matéria orgânica do solo não vem aumentando e deseja começar a retirar a palhada residual do corte para que o solo “respire”, pois segundo ela é o que está prejudicando a produtividade de seu canavial. O produtor está correto? O que pode acontecer se o produtor resolver retirar a palhada residual de sua área?

Resolução da situação-problema

Não, o produtor não está correto e você deve orientá-lo. A manutenção da palhada sob o solo propicia um aumento na biomassa microbiana e aumento na taxa de decomposição e incorporação vegetal à matéria orgânica do solo, aumentando, conseqüentemente a fertilidade do solo. Isso é possível pois, a biomassa microbiana, composta por bactérias, fungos, nematoides e protozoários auxilia na decomposição dos resíduos da cultura anterior devolvendo nutrientes à próxima cultura. Isso só acontecerá se houver matéria orgânica morta no solo, uma vez que ela atua primordialmente como agente de decomposição dos resíduos do solo. Assim, explique ao produtor ainda que caso resolvesse retirar a palhada, o solo ficaria exposto às radiações solares, perda de água, de matéria orgânica e ainda correria o risco de lixiviações e erosões.

Faça valer a pena

1. O termo matéria orgânica do solo se refere a todos os compostos que contêm carbono orgânico em sua composição. Ao contrário do que muitos pensam, ele não inclui apenas tecidos vegetais e animais em decomposição, mas sim todos os organismos vivos ou mortos, os produtos da decomposição e ainda substâncias orgânicas microbiológicas. A biomassa microbiana, por sua vez, se trata da principal constituinte da MOS viva, excluindo-se as raízes e os animais maiores que $5 \times 10 \mu\text{m}$.

Assinale a seguir o microrganismo presente em maior quantidade na biomassa microbiana de um solo:

- a) Vírus.
- b) Bactérias.
- c) Protozoários.
- d) Fungos.
- e) Nematoides.

2. Em relação ao metabolismo microbiano, analise as asserções a seguir:

- I. As reações catabólicas ou degradativas são aquelas que produzem e liberam energia, sendo chamadas reações exergônicas.
- II. As reações anabólicas ou de biossíntese são aquelas que consomem energia, chamadas reações endergônicas e são reguladas por enzimas que a requerem.
- III. Um exemplo de reação anabólica é a quebra de açúcares como glicose e frutose em dióxido de carbono e água.
- IV. Um exemplo de reação catabólica é a síntese de proteínas a partir de aminoácidos.

Assinale a alternativa que contém apenas as asserções corretas:

- a) I, apenas.
- b) III, apenas.
- c) I e II, apenas.
- d) II e III, apenas.
- e) I, II, III e IV.

3. Analise as asserções a seguir e a relação proposta entre elas:

I. As enzimas têm participação especial nos ciclos dos elementos do solo, sendo primordiais para as transformações bioquímicas no sistema solo-planta.

PORQUE

II. As enzimas mais estudadas estão ligadas aos ciclos da matéria orgânica no solo e dos macronutrientes carbono (C), nitrogênio (N), enxofre (S) e fósforo (P).

Assinale a alternativa que apresenta a correta relação entre as asserções apresentadas.

- a) A asserção I é verdadeira e a II é falsa.
- b) A asserção I é falsa e a II é verdadeira.
- c) As asserções I e II são verdadeiras e a II é uma justificativa da I.
- d) As asserções I e II são verdadeiras mas a II não é uma justificativa da I.
- e) As asserções I e II são falsas.

Seção 3.3

Impacto do manejo agrícola na microbiota do solo

Diálogo aberto

Olá, aluno! Chegamos na última seção dessa unidade e agora concluiremos nosso estudo sobre o impacto do manejo agrícola na microbiota do solo, ou seja, veremos como as práticas culturais do dia a dia podem influenciar negativamente na biomassa microbiana e quais técnicas podemos utilizar visando a conservação do solo e do seu metabolismo.

Para isso, vamos finalizar o seu trabalho. O produtor para o qual você vem trabalhando enfrentava problemas com a produtividade de sua lavoura de milho, você se lembra? Você identificou que boa parte da responsabilidade disso poderia ser o pH ácido do solo que já foi corrigido. Vocês também decidiram realizar o plantio de soja, realizando a rotação de culturas para melhorar a qualidade e fertilidade do solo e ainda, na última visita, decidiram que o ideal é que esse plantio fosse realizado diretamente na palha da cultura anterior, para que não houvesse o revolvimento do solo e assim, a manutenção e possível aumento da biomassa microbiana ali existente.

O produtor está muito satisfeito com seu trabalho e deseja continuar trabalhando de maneira sustentável, adotando técnicas de manejo que permitam a conservação do solo da matéria orgânica ali presente. O produtor está consciente de que isso será uma grande mudança e que envolverá todas as práticas culturais, não somente o plantio.

Quais as demais práticas de manejo de uma lavoura podem prejudicar a microbiota do solo? Quais seriam as demais sugestões para que o produtor possa obter produtividade agrícola aliada à conservação da matéria orgânica do solo e da biomassa microbiana ali existente?

Chegou o momento de finalizar essa etapa de sua consultoria. Responda as perguntas do produtor e prepare a ele um relatório das suas visitas e orientações anteriores. Lembre-se que, como conclusão desse relatório, você deverá identificar os efeitos do manejo agrícola

realizado pelo produtor sobre a microbiota do solo, procurando restaurar o equilíbrio ambiental dos processos bioquímicos e diminuir a necessidade de adubação constante. Mãos à obra!

Não pode faltar

Você já sabe que os microrganismos são de grande importância para o metabolismo do solo, uma vez que a microbiota do solo é responsável por processos importantes como a decomposição da matéria orgânica, a ciclagem dos nutrientes, o fluxo de energia nos ecossistemas, a fixação do nitrogênio atmosférico, entre outros inúmeros que temos estudado desde o início dessa disciplina. Você também já sabe que a produtividade agrícola e a sustentabilidade dos agroecossistemas dependem da diversidade microbiológica e da biomassa microbiana presente no solo, sendo um fator importante a ser considerado para a manutenção da qualidade de solo.

A partir de agora o que estudaremos é que, em virtude da intensificação da produção agrícola, práticas de manejo como preparo do solo, plantio, uso de inseticidas, fungicidas, herbicidas e adubos podem alterar consideravelmente o equilíbrio da matéria orgânica do solo. Quando se trata da microbiota nele existente, que pode ter sua diversidade reduzida, assim como sua atividade. Nesse sentido, parte da sua responsabilidade como profissional é pensar que, além de garantir a produtividade agrícola, você deve também orientar o produtor em relação aos possíveis inconvenientes que possam ocorrer, trabalhando com preocupação em relação ao meio ambiente.

Se hoje podemos olhar para trás e ver como a agricultura evoluiu, com certeza parte dessa evolução se deve à mecanização das operações no campo. Ela tornou o trabalho agrícola mais rápido e eficiente, as áreas plantadas mais homogêneas e, conseqüentemente, mais produtivas. Entretanto, com o aumento do tráfego de máquinas e das novas técnicas de cultivo com maior uso de defensivos, herbicidas e adubos, veio também a preocupação com a conservação dos recursos naturais e a sustentabilidade da agricultura.

A influência do preparo do solo é o primeiro tópico que iremos estudar nesta seção, pois desde o estabelecimento de nova cultura até a sua colheita podemos ter influências no sistema solo e nos microrganismos ali existentes, influenciando diretamente na disponibilidade, na qualidade e na quantidade dos nutrientes que serão disponibilizados para as plantas.

De acordo com Dadalto et al. (2015), o metabolismo do solo, por meio da atividade microbiana, pode ser relacionado à qualidade do solo e à sua degradação, sendo necessária a análise do teor de carbono e da biomassa microbiana para identificar em que estado esse recurso natural se encontra. Assim, conhecendo-se como o preparo do solo pode impactar a microbiota do solo, podemos analisar os efeitos e procurar mitigar os pontos negativos, buscando sistemas mais adequados a cada tipo de solo e a cada cultura a ser implementada.

O solo para plantio pode ser preparado segundo duas diferentes vertentes: por meio do sistema convencional ou por meio dos sistemas conservacionistas, que como o próprio nome já diz, visa a conservação desse recurso natural minimizando os impactos a ele. Entre os principais sistemas estão o plantio direto (estudado brevemente na Seção 3.2) e o cultivo mínimo, respectivamente. Vamos conhecer melhor a diferença entre eles, para que possamos compreender os impactos de cada um?

O plantio convencional é realizado após o preparo do solo com o arado e grade. O arado tem a função de cortar, tombar e inverter o solo, mobilizando-o de maneira intensa. Durante a aração, tudo que se encontra na superfície do solo é incorporado a ele, incluindo a matéria orgânica vegetal. Já o uso da grade irá destorroar e nivelar o solo, deixando-o pronto para o plantio (DADALTO, 2014).

Nos sistemas de preparo conservacionistas, o solo é menos mobilizado, uma vez que altera minimamente sua estrutura. No plantio direto, realiza-se a semeadura sob a palhada da cultura anterior. Essa prática promove uma pequena alteração na estrutura do solo, uma vez que ele é sulcado ("cortado") somente onde a semente será plantada. Já no cultivo mínimo, a diferença é que o preparo do solo é realizado apenas na linha de plantio. Ambos os sistemas conservacionistas mantêm os resíduos vegetais na superfície do solo, protegendo-o (DADALTO, 2014).



Refleta

Se no preparo de solo convencional a matéria orgânica é incorporada ao solo, por que os sistemas de preparo conservacionistas são os que interferem menos na atividade microbiana do solo? A incorporação da matéria orgânica vegetal não deveria proporcionar o aumento da biomassa microbiana e o aumento da taxa de decomposição?

De acordo com Dadalto (2014), a forma de preparo do solo pode interferir na biomassa microbiana e no metabolismo do solo, pois o teor de carbono orgânico do solo pode ser alterado, bem como a densidade do solo, sua temperatura e sua umidade. Esses últimos fatores podem ser agravados pela maior exposição aos raios ultravioleta no caso do sistema de preparo convencional, que deixa o solo revolvido e os microrganismos sujeitos a fatores negativos a eles (fatores estes estudados na Seção 3.1).

No plantio direto temos um ponto negativo que é a baixa incorporação dos resíduos vegetais ao solo. Isso pode diminuir temporariamente o metabolismo do solo e, assim, diminuir a taxa de decomposição dos compostos orgânicos. Entretanto, quando a aração e a gradagem são realizadas, o solo aumenta sua taxa de decomposição e não acumula a matéria orgânica, podendo alterar algumas de suas propriedades como sua formação; a estabilidade dos agregados; a retenção de água e a aeração (DADALTO, 2014). Mas se o plantio convencional prejudica a microbiota do solo, por que continuamos fazendo?

Segundo Tormena et al. (2004), dependendo do tipo de solo, do clima da região e da cultura a ser implantada, os sistemas de preparo podem degradar a qualidade física do solo. Entretanto, os diferentes sistemas de preparo podem, em contrapartida, oferecer as condições adequadas para o crescimento, desenvolvimento e produtividade das diferentes culturas, em diferentes situações e tipos de solo.



Exemplificando

Em solos arenosos e com baixo teor de matéria orgânica, por exemplo, o revolvimento excessivo ocasiona altas taxas de erosão, de compactação e também perda de matéria orgânica, resultando na degradação física, química e biológica dos solos. Em contrapartida, em algumas regiões do Brasil o sistema mais utilizado para o cultivo ainda é o preparo convencional, em virtude da disponibilidade de equipamentos para os produtores e da tradição dos produtores da região (TORMENA et al., 2004).

Após o plantio, quando a cultura começa a se desenvolver, surgem as pragas e as doenças, e com elas também o uso dos agrotóxicos como estratégia de controle, para que não atinjam o nível de dano

econômico. Nesse contexto, o uso indiscriminado de inseticidas, fungicidas, nematicidas e outros defensivos agrícolas pode ocasionar, além de contaminações dos recursos hídricos, também a perda de biodiversidade do solo e do ecossistema como um todo.

Isso pode ser explicado, pois parte do produto aplicado cai diretamente no solo e outra parte, que está nas plantas, é levada pela chuva para os recursos hídricos e o solo, onde se acumula agindo de maneira tóxica aos organismos ali existentes.

De acordo com Gomes et al. (2010), a maioria dos defensivos agrícolas tem efeito tóxico sobre os organismos e pode ser considerado poluente. Sua toxicidade depende, principalmente, da concentração em que é aplicada, uma vez que o princípio ativo pode ser inofensivo em baixas concentrações ou se tornar progressivamente tóxico e até letal em grandes concentrações (GOMES et al. 2010).

Ainda de acordo com Gomes (2010), o uso de defensivos, em pequenos volumes e em curta escala de tempo, proporciona benefícios para a produtividade agrícola, uma vez que é eficiente para a finalidade a que se destina. Mas, quando utilizado indiscriminadamente e em sequência de safras, deixa o solo degradado com menor oferta de nutrientes para as culturas.



Assimile

Se os defensivos químicos em grandes quantidades tornam-se tóxicos aos organismos do solo, e se a microbiota do solo é a responsável pela ciclagem de nutrientes no ecossistema, logo podemos concluir que a menor disponibilidade de nutrientes para a planta após aplicações consecutivas de agrotóxicos acarretou na diminuição da biomassa microbiana do solo, não é mesmo?

Além da toxicidade, de acordo com Tokeshi (s/d), ao adubarmos as plantas excessivamente com fertilizantes nitrogenados ou fazermos aplicações com outros produtos fitossanitários que impedem a síntese de proteínas, aumenta-se a exsudação de aminoácidos e açúcares das folhas e raízes das plantas para o solo. Estes exsudados passam a atuar como estimulantes, induzindo multiplicação de microrganismos fitopatogênicos, ocasionando doenças como podridões das raízes e murchas de bactérias, por exemplo (TOKESHI, [s.d.]).

Assim, como consequência do uso excessivo de adubos, podemos diminuir a biodiversidade do solo pela sua toxicidade e ainda aumentamos a suscetibilidade da planta a pragas e doenças, em virtude do aumento da excreção de aminoácidos e açúcares livres e do desequilíbrio nutricional da planta.

Como alternativa ao uso constante de defensivos agrícolas e fertilizantes sintéticos, outras estratégias visando o aumento da produtividade podem ser utilizadas, como uma produção baseada na sustentabilidade e com princípios de Manejo Integrado de Pragas e Doenças, bem como formas orgânicas de adubação. De acordo com Gomes et al. (2010) também podemos utilizar esterco animal, rotação de culturas, adubação verde e compostagem como técnicas de manejo do solo.

Outra prática muito realizada no campo é o uso de herbicidas, um fator importante na agricultura atualmente. Nossa dependência a esse tipo de produto é cada vez maior em decorrência da interferência das plantas daninhas na produtividade agrícola e da falta de outra alternativa para controlá-las, principalmente em grandes áreas, de monocultura, por exemplo.

Em virtude desse grande uso e dependência das culturas, o controle de plantas daninhas torna-se um dos principais fatores que podem alterar a microbiota dos solos agrícolas. Isso pode ser comprovado pelos resultados das pesquisas desenvolvidas nas últimas décadas neste assunto, que demonstram os efeitos dos herbicidas na microbiota do solo e na natureza (CHILD, 2007). Os efeitos dos herbicidas podem ser diferentes em função do princípio ativo do herbicida e das doses utilizadas.

De acordo com Childs (2007), a alteração da biomassa microbiana e dos processos bioquímicos do solo pode ser fundamental para a produtividade de uma cultura e, geralmente, a toxicidade aos microrganismos do solo é considerada para altas dosagens de todos herbicidas. Além disso, o uso constante de herbicidas pertencentes ao mesmo grupo químico pode desencadear alterações de difícil reversibilidade, caso não sejam considerados os intervalos necessários para a recuperação do solo.

Entretanto, ainda de acordo com Childs (2007), é necessário considerar também que os impactos para as doses reais podem estar

relacionados a algum grupo específico de microrganismos e ainda ser transitórios, de acordo com o tempo de ação do produto.

Os mesmos microrganismos que podem ser prejudicados por altas concentrações dos herbicidas, podem atuar benéficamente para a eliminação dos seus resíduos no ambiente, uma vez que também podem realizar a transformação de compostos químicos, diminuindo a persistência dos resíduos de herbicidas no solo. No sistema de plantio direto, por exemplo, os herbicidas são utilizados na dessecação da cultura existente para que posteriormente ocorra o plantio, certo? É essa mesma palhada que irá promover o aumento da atividade microbiana, proporcionando a aceleração da degradação de herbicidas no solo (PRATA; LAVORENTI, 2000).

Por fim, a irrigação também é uma prática de manejo de culturas muito utilizado para aumentar a produção agrícola, principalmente em regiões com variação dos regimes pluviométricos ou semiáridas. Nessas áreas irrigadas, geralmente intensifica-se a produção, e as culturas são sucessivamente substituídas, contribuindo para um maior desgaste do solo. Nesse sentido, as práticas adotadas podem ser tanto positivas quanto negativas, dependendo do tipo e das condições do solo, assim como o tipo de irrigação e a qualidade e quantidade de água disponibilizada.

Segundo estudos de Santos e Ribeiro (2002), as propriedades químicas do solo mais afetadas pela irrigação são a capacidade de troca de cátions, a condutividade elétrica, o pH e a quantidade de matéria orgânica. De acordo com os autores, há uma tendência de se aumentar os íons de cálcio, magnésio e potássio, em virtude, principalmente, da aplicação de matéria orgânica, fertilizantes e sais que geralmente são dissolvidos na água da irrigação. Entretanto, outros autores também relatam o aumento da acidez, resultados que podem ser explicados de acordo com o manejo adotado nas áreas.



Pesquise mais

Quer conhecer mais sobre os efeitos da irrigação nas propriedades químicas do solo? Leia o artigo completo de Santos; Ribeiro (2002) indicado a seguir:

SANTOS, E. E. F.; RIBEIRO, M. R. Influência da irrigação e do cultivo nas propriedades químicas de solos da região do submédio São Francisco.

Acta Scientiarum. Maringá, v. 24, n. 5, p. 1507-1516, 2002. Disponível em: <<https://goo.gl/uz59T1>>. Acesso em: 6 jun. 2018.

Se desejar conhecer mais um pouco mais sobre os efeitos dos agroquímicos sobre os microrganismos do solo, leia ainda o artigo:

MALTY, J. S.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Efeitos do glifosato sobre microrganismos simbiotróficos de soja, em meio de cultura e casa de vegetação. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 41, n. 2, p. 285-291, fev. 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pab/v41n2/a13v41n2.pdf>>. Acesso em: 1 jul. 2018.

Assim, nesta unidade, após conhecer os fatores que interferem na microbiota do solo, um pouco sobre os processos bioquímicos que nele ocorrem e como as práticas de manejo agrícola podem influenciar na microbiota, podemos concluir que as técnicas agrícolas atuais, como o preparo do solo com equipamentos pesados, o uso de agrotóxicos (sejam eles inseticidas, fungicidas, nematicidas, bactericidas ou herbicidas) e também de irrigação, podem degradar o meio ambiente e solo se não utilizados de maneira consciente. Nesse sentido, a mensagem que essa unidade quis passar é que é de grande importância que você, como profissional, possa trabalhar com vistas à conservação de nossos recursos naturais e biodiversidade, recomendando o uso de produtos fitossanitários, fertilizantes e corretivos de maneira que não prejudiquem o solo, a água, o trabalhador rural e a saúde dos consumidores.

Sem medo de errar

Chegamos ao final de mais uma unidade e, com ela, a conclusão de mais um desafio dentro de seu cotidiano profissional. Após conhecer o impacto das principais técnicas de manejo agrícola, você com certeza se sentirá seguro para concluir mais uma etapa de seu trabalho, vamos retomá-lo?

O produtor para o qual você vem trabalhando desde o início dessa unidade estava enfrentando problemas com a produtividade de sua lavoura de milho e você, agrônomo, identificou que boa parte da responsabilidade disso poderia ser do pH ácido do solo, corrigindo-o. Posteriormente, você o orientou a fazer o plantio de soja para rotação de culturas e que o plantio fosse realizado diretamente na

palha da cultura anterior, para possibilitar a manutenção e o possível aumento da biomassa microbiana ali existente.

Agora, o produtor deseja continuar adotando técnicas de manejo que permitam a conservação do solo da matéria orgânica ali presente, entretanto não sabe por onde começar. Quais as demais práticas de manejo de uma lavoura podem prejudicar a microbiota do solo? Quais seriam as demais sugestões para que o produtor possa obter produtividade agrícola aliada à conservação da matéria orgânica do solo e da biomassa microbiana ali existente?

Você deve orientar o produtor que, além do preparo convencional do solo para plantio, o uso de inseticidas, fungicidas, fertilizantes, herbicidas e também da irrigação, podem todos possibilitar a degradação do solo e a perda de biodiversidade se não forem adotadas de maneira consciente.

Explique a ele que a forma de preparo do solo pode interferir na biomassa microbiana e no metabolismo do solo também, pois o teor de carbono orgânico do solo pode ser alterado, bem como a sua densidade, temperatura e umidade. Esses últimos fatores podem ser agravados pela maior exposição aos raios ultravioleta, no caso do sistema de preparo conservacionista, que deixa o solo revolvido e os microrganismos sujeitos a fatores negativos a eles.

Além disso, o uso indiscriminado de defensivos químicos pode ocasionar contaminações dos recursos hídricos, pois parte do agrotóxico aplicado cai diretamente no solo, e a outra parte, que está nas plantas, é levada pela chuva para os recursos hídricos e o solo, onde se acumula agindo de maneira tóxica aos organismos ali existentes.

O controle de plantas daninhas, em especial, torna-se um dos principais fatores que podem alterar a microbiota dos solos agrícolas, pelo uso dos herbicidas. Entretanto, assim como acontece com outros defensivos agrícolas e fertilizantes, os efeitos dos herbicidas podem ser diferentes em função do princípio ativo e das doses utilizadas.

Por fim, a irrigação pode alterar a capacidade de troca de cátions, a condutividade elétrica, o pH e a quantidade de matéria orgânica.

Como formas de manejo mais sustentáveis e adequadas, você pode sugerir ao produtor que substitua o plantio convencional pelo plantio direto, que é uma técnica conservacionista e não agride a estrutura e a microbiota do solo. Além disso, utilizar práticas de

Manejo Integrado de Pragas (MIP), reduzindo o uso de inseticidas e fungicidas e considerar o tempo necessário entre uma aplicação de herbicida e outra, para que o solo tenha tempo de se recuperar da agressão do efeito residual. Para os produtos fitossanitários, é importante considerar que as dosagens devem ser respeitadas, assim como os métodos de aplicação, para que a contaminação do solo e dos recursos hídricos aconteça o mínimo possível.

Agora, não deixe de consolidar em um relatório para o produtor rural todas as orientações que você forneceu até aqui, consolidando todos os encontros anteriores. Esse relatório deve identificar os efeitos do manejo agrícola realizado pelo produtor sobre a microbiota do solo, além das recomendações sugeridas ao longo da consultoria, procurando restaurar o equilíbrio ambiental dos processos bioquímicos e diminuir a necessidade de adubação constante. Bom trabalho!

Avançando na prática

Uma entrevista para a TV

Descrição da situação-problema

Você é um agrônomo conceituado na cooperativa em que trabalha e nos últimos meses vem fazendo um trabalho de conscientização com os cooperados em relação à conservação do solo. Para auxiliar a divulgação do projeto, vocês chamaram o Canal Rural (emissora de TV voltada para o público do campo) para realizar algumas reportagens e entrevistas com profissionais sobre diferentes temas, que serão veiculados semanalmente. O tema dessa semana é a matéria orgânica e a manutenção da microbiota do solo, e você será o profissional entrevistado. A repórter solicita que você faça um depoimento sobre a importância do tema, e como as práticas de manejo das culturas podem influenciar na qualidade do solo. E agora? Como explicar em poucas palavras para gravar o seu depoimento?

Resolução da situação-problema

É imprescindível que para falar sobre a matéria orgânica do solo e a conservação da microbiota, você comece seu depoimento

falando sobre a importância dos microrganismos para ele. Nesse sentido, comece explicando que os microrganismos são de grande importância para a produtividade agrícola, uma vez que a microbiota do solo é responsável por processos importantes, como a decomposição da matéria orgânica, a ciclagem dos nutrientes, o fluxo de energia nos ecossistemas, a fixação do nitrogênio atmosférico, entre outros processos que permitem com que a planta se desenvolva e produza.

Em seguida, explique que atualmente, em virtude da intensificação da produção agrícola, práticas de manejo como preparo do solo, plantio, uso de defensivos químicos e adubos podem alterar consideravelmente o equilíbrio da matéria orgânica do solo. Além disso, quando se trata da microbiota nele existente, pode ter sua diversidade reduzida, assim como sua atividade. Deste modo, é importante pensar que, além de garantir a produtividade agrícola, é necessário também que o produtor conheça os possíveis inconvenientes que possam ocorrer, trabalhando com preocupação em relação ao meio ambiente.

Faça valer a pena

1. Leia o trecho da matéria a seguir:

Simpósio de agricultura resgata benefícios do plantio direto

O engenheiro agrônomo Michael Araújo Oliveira, presidente do GPP, explica que as estratégias de plantio direto trazem benefícios especialmente para o solo, conservando os recursos naturais e reduzindo a zero o índice de erosão causada pela chuva. "Outro ponto muito importante é que a melhoria da estrutura do solo possibilita o aumento no volume de exploração das raízes, promovendo maior ganho de produtividade ao longo dos anos".

Fonte: <<https://goo.gl/FsdJbJ>>. Acesso em: 7 jun. 2018.

Em relação ao ganho de produtividade agrícola pelo plantio direto, é possível afirmar que:

- a) Pode ser explicado pelo alto revolvimento do solo e incorporação da matéria orgânica a ele, que irá favorecer a decomposição dos microrganismos.

- b) Pode ser explicado pela pequena alteração na estrutura do solo e nos microrganismos ali existentes, mantendo sua fertilidade.
- c) Pode ser explicado pelo aumento do teor de nutrientes aplicados com o uso dos herbicidas que são utilizados na dessecação da cultura anterior.
- d) Pode ser explicado pelo baixo uso de agrotóxicos, visto que é uma prática conservacionista e sustentável.
- e) Pode ser explicado pelo constante uso de irrigação, que favorece o aumento da microbiota do solo e desenvolvimento das raízes das plantas.

2. Leia o trecho a seguir:

“Como alternativa ao uso constante de agrotóxicos e fertilizantes sintéticos outras estratégias visando o aumento da produtividade podem ser utilizadas, como uma produção baseada na sustentabilidade e com princípios de _____, bem como formas orgânicas de _____.”

Assinale a alternativa que completa corretamente as lacunas:

- a) Sistemas de plantio direto; produção.
- b) Agricultura orgânica; adubação.
- c) Manejo integrado de pragas e doenças; adubação.
- d) Irrigação; adubação.
- e) Dessecação com herbicidas; produção.

3. Analise as asserções a seguir e a relação proposta entre elas:

- I. A alteração da biomassa microbiana e dos processos bioquímicos do solo pode ser prejudicial para a produtividade de uma cultura.

PORQUE

- II. O uso constante de herbicidas pertencentes ao mesmo grupo químico pode desencadear alterações de difícil reversibilidade, caso não sejam considerados os intervalos necessários para a recuperação do solo.

Assinale a alternativa que apresenta a correta afirmação sobre as asserções:

- a) As asserções I e II estão corretas e a II é uma justificativa da I.
- b) As asserções I e II estão corretas e a II não é uma justificativa da I.
- c) As asserções I e II são falsas.
- d) Apenas a asserção I é verdadeira.
- e) Apenas a asserção II é verdadeira.

Referências

- BLACK, J. G. **Microbiologia**: fundamentos e perspectivas. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.
- CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. 2. ed. ESALQ: Piracicaba, 2016. Disponível em: <<http://www.livrosabertos.sibi.usp.br/portaldelivrosUSP/catalog/book/109>>. Acesso em: 10 maio 2018.
- CHILDS, G. M. F. **Efeitos de Herbicidas na microbiota do solo em sistema fechado**. 2007. 70 f. Tese (Doutorado em Agronomia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal: 2007. Disponível em: <<http://www.fcav.unesp.br/download/pgtrabs/pv/d/2281.pdf>>. Acesso em: 6 jun. 2018.
- COAMO Agroindústria. Rotação de culturas: resultado de 30 anos em pesquisa. **Revista COAMO**. 2018. Disponível em: <<http://www.coamo.com.br/jornal/conteudo.php?ed=0&id=284>>. Acesso em: 28 maio 2018.
- DADALTO, J. P. et al. Sistema de preparo do solo e sua influência na atividade microbiana. **Engenharia agrícola** [online]. 2015, v. 35, n. 3, p. 506-513. Disponível em: <<https://goo.gl/tCF6wL>>. Acesso em: 4 jun. 2018.
- _____. **Preparo do solo e sua influência na atividade microbiana**. 2014. 65 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa: 2014. Disponível em: <<https://goo.gl/ojXUms>>. Acesso em: 04 jun. 2018.
- GOMES, P. V. S. et al. Poluição do solo causada pelo uso excessivo de agrotóxicos e fertilizantes – zona rural, Viçosa - MG. **Centro brasileiro para conservação da natureza e desenvolvimento sustentável**, 2010. Disponível em: <<http://www.cbcn.org.br/simposio/2010/palestras/agrotoxicos.pdf>>. Acesso em: 5 jun. 2018.
- LEITE, L. F. C.; ARAÚJO, A. S. F. Ecologia microbiana do solo. Documentos 164. Teresina: **Embrapa Meio Ambiente**, 2007. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/69637/1/Doc164.pdf>>. Acesso em: 10 maio 2018.
- MACHADO, D. M. et al. Atividades Microbianas e as transformações dos elementos no solo. **Enciclopédia biosfera**. Goiânia: 2012. Disponível em: <<https://goo.gl/k3tSMg>>. Acesso em: 28 maio 2018.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: ed. UFLA, 2006. Disponível em: <<https://goo.gl/jkYsXj>>. Acesso em: 10 maio 2018.
- PRATA, F.; LAVORENTI, A. Comportamento de Herbicidas no solo: influência da matéria orgânica. **Revista biociência**. Taubaté, v. 6, n. 2, p. 17-22, jul.-dez./2000. Disponível em: <<https://goo.gl/9KnbPr>>. Acesso em: 6 jun. 2018.
- SANTOS, E. E. F.; RIBEIRO, M. R. Influência da irrigação e do cultivo nas propriedades químicas de solos da região do submédio São Francisco. **Acta Scientiarum**. Maringá, v. 24, n. 5, p. 1507-1516, 2002. Disponível em: <<http://ojs.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAgron/article/download/2413/1812>>. Acesso em: 6 jun. 2018.

TOKESHI, H. **Efeito dos agrotóxicos no solo**. Fundação Mokiti Okada. Centro de pesquisa Mokiti Okada. s/d. Disponível em: <http://www.cpmo.org.br/artigos/efeito_agrotoxicos_solo_tokeshi.pdf>. Acesso em: 5 jun. 2018.

TORMENA, C. A. et al. Influência de diferentes sistemas de preparo do solo nas propriedades físicas de um Latossolo Vermelho distrófico. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 8, n. 1, p. 65-71, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbeaa/v8n1/v8n1a10.pdf>>. Acesso em: 4 jun. 2018.

Técnicas em microbiologia agrícola

Convite ao estudo

Olá, aluno! Chegamos à última unidade de ensino desta disciplina de Microbiologia Agrícola. Foram muitos estudos até aqui, não é mesmo? Você conheceu as diferentes subáreas dentro da microbiologia e entendeu que a microbiologia agrícola é transversal entre muitas delas, sempre trabalhando para buscar melhoria na produção agrícola, na segurança e qualidade dos alimentos, bem como na agroindústria. Conheceu também os principais microrganismos de importância para o campo e os efeitos positivos e negativos que eles podem causar. Além disso, estudou os fatores ambientais que interferem em seu desenvolvimento a fim de utilizar técnicas de manejo que não interfiram em seu metabolismo, não é mesmo?

Agora, nesta última unidade, você conhecerá a rotina de análises técnicas de um laboratório de microbiologia, em que os microrganismos podem ser amostrados, isolados e identificados, viabilizando sua melhor utilização no campo.

Para isso, você será levado a um novo desafio profissional, em que foi contratado como agrônomo responsável por um laboratório de microbiologia do solo. Dentre suas funções, estão coordenar as pesquisas em andamento, as atividades gerais do laboratório, treinar e acompanhar estagiários, bolsistas e novos funcionários, além de validar todas as análises realizadas, realizando recomendação técnica quando for necessário.

O laboratório hoje está vinculado a uma instituição de pesquisa que estuda fungos micorrízicos, indicadores

microbiológicos de qualidade do solo, estratégias microbiológicas de recuperação de áreas degradadas e microrganismos fitopatogênicos e entomopatogênicos. Além disso, presta serviços à comunidade realizando análises microbiológicas de quantificação de fungos e bactérias no solo, avaliação de fungos micorrízicos no solo e em raízes de plantas, além de identificação de espécies fitopatogênicas e entomopatogênicas.

Logo na sua primeira semana de trabalho, você decidiu acompanhar todas as etapas de uma análise microbiológica do solo, do momento em que a amostra chega ao laboratório até a sua validação, assim, você poderia conhecer melhor os procedimentos e os colaboradores do laboratório. A amostra escolhida é de um produtor que adquiriu novas áreas recentemente e deseja conhecer as condições em que o solo se encontra, solicitando uma análise bioquímica a outro laboratório e uma análise microbiológica a você. Entretanto, você se questiona sobre as etapas que essa amostra deverá passar, tentando se recordar de cada uma delas. Quais são os principais instrumentos e equipamentos de um laboratório de microbiologia? Como a amostra deve ser coletada? E quais seriam os procedimentos para a quantificação de biomassa microbiana e identificação de alguma espécie de microrganismo?

Nesta unidade, você encontrará resposta para todas essas perguntas e será capaz de entregar ao produtor, ao final, uma avaliação de microbiota do solo, por meio da aplicação de técnicas microbiológicas. Animado para começar?

Seção 4.1

Introdução às técnicas microbiológicas

Diálogo aberto

Estamos iniciando a primeira seção desta unidade. A partir de agora você será introduzido no mundo dos laboratórios de microbiologia, com seus equipamentos, instrumentos, normas de segurança e procedimentos para isolamento, quantificação, multiplicação e identificação.

Para começar nosso estudo, vamos retomar seu novo desafio profissional, ao ser contratado com agrônomo responsável por um laboratório de microbiologia do solo. Logo na sua primeira semana de trabalho, você decidiu acompanhar todas as etapas de uma análise microbiológica do solo para que pudesse conhecer melhor os procedimentos e os colaboradores do laboratório.

A amostra que você recebeu e irá acompanhar veio de um produtor que adquiriu novas áreas recentemente e deseja conhecer as condições em que o solo se encontra. Você retirou a amostra na recepção e levou imediatamente para o laboratório, a fim de começar as análises. Antes de iniciar, ainda na área de preparo das amostras, você procura pelo Procedimento Operacional Padrão (POP) do laboratório e não o encontra. Você sabe que esse é um documento primordial para qualquer laboratório, pois minimiza a ocorrência de desvios na execução de cada etapa do processo e deve ser de conhecimento de todos, bem como estar em local de fácil acesso.

Ao ver você procurando pelo POP, um dos estagiários o questiona: "mas o que é, exatamente um POP? Por que é necessário consultá-lo antes de iniciar uma análise? Quem deve elaborar e validar o mesmo? "

Após responder as dúvidas do estagiário, você deve listar os tópicos iniciais que devem conter no POP do laboratório de microbiologia do solo em que trabalha, considerando os

equipamentos e instrumentos de trabalho, as normas de segurança, as técnicas de desinfecção, esterilização e assepsia e os meios de cultura para microrganismos de importância agrícola, que são os primeiros tópicos a se dominar em um laboratório, antes de iniciar sua análise. Mãos à obra!

Não pode faltar

Você vem estudando desde o início dessa disciplina, a importância do estudo da microbiologia agrícola para a sanidade das lavouras, a diminuição de perdas no campo, além do aumento de produtividade agrícola. Estudamos que o conhecimento da microbiologia no campo possibilita o controle dos microrganismos fitopatogênicos, a produção e o uso de microrganismos benéficos e também a conservação do solo, que é depósito natural de microrganismos nos ecossistemas.

A partir de agora, entenderemos como as pesquisas em microbiologia são viabilizadas e, ainda, como tantos microrganismos podem ser isolados, identificados e também produzidos dentro dos laboratórios de microbiologia e as biofábricas de produtos microbianos – que nada mais são do que grandes laboratórios com estrutura física e operacional para desenvolver pesquisas e produzir organismos em larga escala.

Nesses laboratórios existem uma organização, planejamento, procedimentos e métodos utilizados rotineiramente, os quais devem ser respeitados para a qualidade dos serviços prestados e a segurança dos trabalhadores, da comunidade, do meio ambiente e também dos agentes de estudo em relação a possíveis contaminações. E esse é justamente o assunto desta nossa última unidade.

Inicialmente, para se conduzir um trabalho em microbiologia, é preciso conhecer as normas de segurança em um laboratório microbiológico. Essas normas visam, principalmente, assegurar o bom desempenho do trabalho, bem como a segurança daqueles que manipulam os microrganismos, evitando contaminações indesejadas. De maneira geral, as principais normas que devem ser observadas são:

- A roupa de todos colaboradores que trabalham em um laboratório microbiológico, independente da atividade, deve ser sempre protegida por um jaleco/avental. O jaleco protege a pessoa de quaisquer resíduos microbianos que estão sendo manipulados, bem como protege as culturas que estão sendo manipuladas de organismos externos ao ambiente laboratorial, que carregamos conosco no nosso dia a dia. Além disso, o jaleco protege contra queimaduras e/ou outros acidentes com produtos químicos.
- Para se evitar quaisquer contaminações e acidentes, os colaboradores que possuem cabelos longos devem mantê-los presos, assim como a não utilização de acessórios como brincos, colares e anéis. As unhas devem ser sempre cortadas e higienizadas. Em alguns casos, além do jaleco, recomenda-se o uso de toucas, protetores de barba/máscaras, luvas e sapatilhas plásticas descartáveis, como Equipamentos de Proteção Individual (EPIs).
- Dentro de um laboratório não se permite fumar nem se alimentar. Também não é indicado levar qualquer objeto à boca (como lápis, caneta, papel, etc.). As mãos devem estar constantemente limpas sendo que, sobre isso, falaremos de maneira mais aprofundada logo adiante.
- Além das mãos, as bancadas, equipamentos e todos os utensílios do laboratório devem ser mantidos sempre limpos. As bancadas, em especial devem ser sempre livres de todo o material que não estiver sendo utilizado no momento. Limpeza e assepsia do ambiente também é um assunto que será abordado com mais detalhes nesta seção.
- Evitar manter e manipular com cuidado os objetos ou produtos inflamáveis que se encontrarem próximos de chamas.
- Não aspirar nem levar à boca qualquer produto ou meio de cultura com ou sem microrganismos.
- Comunicar imediatamente qualquer acidente como perfuração, corte ou queimadura.

- Antes de utilizar qualquer equipamento ou iniciar qualquer procedimento pela primeira vez, deve-se ler as normas de utilização, bem como a descrição das etapas a serem realizadas.

Além de seguir as normas de segurança de um laboratório, é importante também localizar e saber interpretar o mapa de riscos do local. Ele é uma representação gráfica dos riscos presentes no local, sejam eles riscos físicos, químicos, biológicos ou de acidentes, por exemplo. Sua elaboração é realizada sobre a planta baixa do espaço físico onde círculos de diferentes tamanhos e cores informam os funcionários quais as ameaças presentes, sendo uma ferramenta importante para a segurança do trabalhador.

Mas em relação às normas de utilização dos equipamentos e descrição de procedimentos, você sabe onde eles devem estar contidos? Seria no manual de cada equipamento?

Todo laboratório deve possuir em suas dependências, um documento chamado Procedimento Operacional Padrão (POP). Esse documento expressa as normas de segurança do local, a listagem e o funcionamento dos equipamentos, o planejamento de quaisquer trabalhos que possam ser executados, as instruções sequenciais das operações, além a frequência de execução de cada uma.

O POP em um laboratório, seja ele qual for, tem como objetivo a padronização das operações e a minimização de erros na execução das tarefas, visando o funcionamento correto e a qualidade do processo. Ou seja, o POP garante aos colaboradores – sejam eles novos ou antigos – que a qualquer momento realizem suas funções de maneira padronizada, minimizando as variações causadas por imprudência, diferentes entendimentos ou interpretações e adaptações aleatórias. Ele deve ser elaborado por profissional qualificado e experiente, devendo ser aprovado, assinado, datado e revisado anualmente ou conforme necessário pelo responsável técnico do laboratório. Vamos conhecer um pouco mais sobre a elaboração de um Procedimento Operacional Padrão?

Deve-se descrever, uma a uma, cada tarefa rotineira realizada pelo laboratório em questão. Essa é uma tarefa trabalhosa e delicada, pois cada etapa deve ser clara e objetiva para que não seja interpretada

incorretamente pelo leitor. A linguagem a ser utilizada deve ser coerente com o grau de instrução dos colaboradores envolvidos nas tarefas. Assim, o conteúdo do POP e sua aplicação, deve ser de total entendimento para aqueles que terão participação direta e/ou indireta na qualidade dos procedimentos a serem realizados.



Exemplificando

Um erro muito comum na elaboração de POPs é a linguagem. Muitas vezes, o autor deseja ser muito formal na elaboração do documento, e acaba não atingindo o público ao qual se destina. Por exemplo, não se utiliza linguagem científica se o POP se destinar, preferencialmente, a assistentes e auxiliares de laboratório que não possuam ou ainda não tenham concluído o ensino superior. Normalmente a displicência nesse ponto pode ocasionar ineficiência na operação e na implantação de um Sistema da Qualidade, por exemplo.

É importante, ainda, que os procedimentos não sejam copiados de outras organizações, uma vez que existem peculiaridades que podem ocorrer apenas no laboratório para o qual o POP está sendo redigido. Além disso, deve-se traçar uma periodicidade para que o material passe por uma análise crítica. Nessa análise, deve-se verificar a aplicabilidade dos procedimentos, se eles continuam sendo realizados e possíveis alterações que tenham sido realizadas na prática.



Pesquise mais

Quer conhecer um exemplo de Procedimento Operacional Padrão de um laboratório de microbiologia?

O Instituto de Previdência dos Servidores do Estado de Minas Gerais (IPSEMG) disponibiliza seu POP para a realização de cultura para fungos, veja:

IPSEMG. **Procedimento Operacional Padrão:** realizar cultura para fungos. Disponível em: <http://www.ipsemg.mg.gov.br/ipsemg/ecp/files.do?evento=download&urlArqPlc=pop_lab_mic_-_025_2019.pdf>. Acesso em: 11 jun. 2018.

Nesse momento, não se preocupe com o conteúdo desse POP, atente-se apenas ao formato e linguagem. Nos aprofundaremos nas técnicas específicas para os laboratórios de Microbiologia Agrícola nas seções seguintes!

Além de conhecer os procedimentos, é importante que todos conheçam os equipamentos, vidrarias e demais materiais essenciais para as atividades de microbiologia. Um laboratório de microbiologia agrícola, especificamente, deve conter os equipamentos e materiais básicos para se trabalhar com microrganismos de maneira geral. Sendo assim, estudaremos aqui aqueles mais utilizados em um laboratório de pesquisa, análise ou produção de microrganismos.

Um dos mais importantes equipamentos de um laboratório microbiológico é o **microscópio óptico** (Figura 4.1a), com lentes objetivas para aumento de 10x, 20x, 40x e 100x. Ele permitirá que os microrganismos sejam visualizados em trabalhos de identificação, isolamento e quantificação, por exemplo.

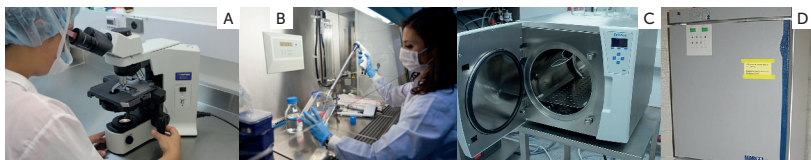
Além do microscópio, é importante também a utilização de equipamentos que permitam a incubação dos microrganismos, seja para germinação e cultura ou para preservação de isolados e amostras. Nesse sentido, utilizamos **incubadora/câmara B.O.D** (do inglês *Biochemical Oxygen Demand*, que significa demanda bioquímica de oxigênio - DBO) para manutenção das culturas em temperatura, umidade, oxigenação e luminosidade controladas, de acordo com a necessidade de cada uma. Já para a preservação de amostras e isolados, utilizamos geladeira e freezer comum ou **ultrafreezer** (-80 °C).

Outro importante equipamento em um laboratório de microbiologia é a **capela de fluxo laminar** (Figura 4.1b). Ela permite, por meio do seu fluxo de ar estéril, a manipulação de materiais biológicos que não possam ser contaminados, garantindo a segurança da manipulação de culturas puras, por exemplo.

Além desses, existem ainda os equipamentos responsáveis pela esterilização dos materiais utilizados rotineiramente, deixando-os livres de quaisquer contaminações. A **autoclave**

(Figura 4.1c) é um aparelho que utiliza o calor úmido juntamente com a pressão esterilização, garantindo que não sobre nenhum tipo de microrganismo nos itens. Já a **estufa ou forno de Pasteur** (Figura 4.1d), utiliza apenas o calor seco, mantendo a temperatura necessária para a secagem ou esterilização dos materiais. Em ambos os casos, fatores como temperatura e tempo de manutenção no equipamento serão fundamentais para o sucesso das atividades do laboratório.

Figura 4.1. | Exemplos de alguns equipamentos para laboratório de microbiologia: (a) microscópio óptico; (b) capela de fluxo laminar; (c) autoclave; (d) estufas para secagem



Fonte: (a) Pixabay.; (b) iStock.; (c) <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Autoclave_de_laboratorio.jpg>; (d) <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Du%C5%BCy_inkubator.JPG>. Acesso em: 12 jun. 2016.



Pesquise mais

Em um laboratório microbiológico devem existir ainda o destilador ou deionizador de água, banho maria, estereomicroscópio (lupa), contador de colônias, câmara de Neubauer (para contagem de esporos) e vidrarias em geral. Para conhecer mais sobre os materiais e equipamentos de um laboratório de microbiologia, leia as páginas 7 a 12 do material indicado a seguir!

RESENDE, F. M. **Manual de segurança do laboratório de microbiologia.**

João Pessoa: UFPB, 2014. Disponível em: <<http://www.ctdr.ufpb.br/ctdr/contents/documentos/pdf/manual-de-seguranca-do-laboratorio-de-microbiologia-v-01-2014>>. Acesso em: 12 jun. 2018.

Quando falamos em esterilização, logo nos vem em mente o processo de eliminação dos microrganismos de determinado utensílio. Mas você sabe qual é a diferença entre esterilização, desinfecção e assepsia? Ambos realizam o controle de microrganismos utilizando-se de processos físicos ou agentes químicos, entretanto veremos que possuem conceitos diferentes.

A **esterilização** é a eliminação de todas as formas de vida de determinado material, sejam elas células vegetativas ou esporos. Para a esterilização utiliza-se majoritariamente processos físicos. Já a **desinfecção**, promove a eliminação apenas das formas de vida vegetativas dos microrganismos, não eliminando necessariamente formas esporuladas. Geralmente os métodos de desinfecção utilizam-se de substâncias químicas e servem para superfícies e materiais. A **assepsia**, por sua vez, refere-se à utilização de agentes químicos para impedir a multiplicação microbiana, sem necessariamente eliminá-la.



Assimile

De maneira geral, vamos resumir quais são os agentes químicos e quais são processos físicos de controle microbiano? Veja:

Agentes Químicos: álcool etílico (70%), formaldeído (3-8%), cloro, iodo, creolina, entre outros.

Processos Físicos: calor úmido (autoclaves), calor seco (estufas), filtração (capela de fluxo laminar) e radiações (luz ultravioleta).

Veja com mais detalhes as recomendações para cada um deles no Quadro 4.1.

Quadro 4.1. | Recomendações para utilização dos métodos físicos de esterilização

Método	Tipo	Utilizado para	Recomendação
Calor seco	Esterilização por ar quente	Vidrarias em geral	Forno de Pasteur ou Estufas elétricas. 100-170 °C por duas a três horas
	Flambagem	Alças, tesouras, pinças e instrumentos de inoculação	Aquecimento do material direto na chama
	Incineração	Eliminação de material	Queima total

Calor úmido	Vapor d' água sob pressão	Meios de cultura, vidrarias, instrumentos em geral	Autoclave; 120 °C por 15-40 minutos
	Tindalização ou esterilização fracionada	Meios de cultura, vidrarias, instrumentos em geral	Aquecimento do material a 100 °C durante três dias consecutivos, por 20 minutos, considerando-se um intervalo de 24 horas entre aquecimentos.
	Pasteurização	Meios de cultura, vidrarias, instrumentos em geral	Temperaturas de 75-80 °C por 30 minutos, seguido de resfriamento rápido.
Radiação	Radiação ultravioleta	Alças, tesouras, pinças e instrumentos de inoculação	Luz ultravioleta na faixa de 200 a 300 nanômetros.

Fonte: adaptado de Almeida et al. (2014)

Apesar de serem eficientes em sua ação microbiana, os agentes químicos e os processos físicos podem sofrer influências que afetam em sua ação. Essas influências podem estar relacionadas ao microrganismo, ao ambiente e ao tempo de exposição. Em relação ao microrganismo, as formas vegetativas e células mais jovens são mais susceptíveis em relação às formas esporuladas e células mais velhas, que são mais resistentes.

Além disso, quanto maior for a quantidade de microrganismos presentes em determinado local ou material, mais difícil será realizar a assepsia, desinfecção ou esterilização, uma vez que será maior a chance de restarem formas resistentes. Por isso é sempre importante uma boa higienização dos materiais antes de colocá-los na autoclave ou estufa, por exemplo.

Em relação ao ambiente ou o material em que se encontram os microrganismos – quando o pH for ácido –, os processos físicos por calor serão mais eficientes. Os materiais aquosos também são de mais fácil eliminação de microrganismos em comparação aos materiais viscosos ou densos. Em todos os casos, quanto maior a

temperatura, maior será a possibilidade de eliminação. Por fim, o último fator é o tempo. Nesse ponto é importante salientar que os processos não são instantâneos e, quanto maior o tempo, maior será a possibilidade de eliminação dos microrganismos indesejados.



Refleta

Se você deseja realizar uma esterilização do material que utilizará para o isolamento de um microrganismo, mas ainda não foi lavado antes de você colocar na autoclave, você terá um bom resultado?

Além do cuidado com as superfícies, com os materiais utilizados, é preciso ainda realizar a correta assepsia das mãos, pois são elas que irão manipular os microrganismos e utensílios. Sendo assim, a lavagem das mãos visa a remoção da maioria dos microrganismos nelas presentes, reduzindo a transmissão de microrganismos indesejados pelas mãos, prevenindo e controlando, assim, contaminações.

A eficácia da lavagem das mãos dependerá muito da técnica. Recomenda-se lavar com água e sabão por 30 a 45 segundos. Veja na Figura 4.2 o processo e a técnica correta.

Figura 4.2. | Processo de lavagem das mãos

Higienização simples das mãos com água e sabão

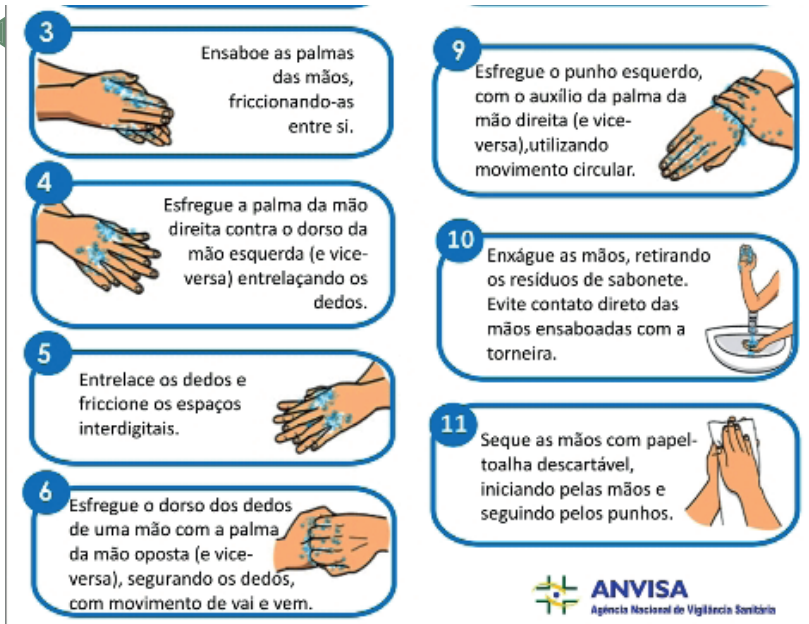


- 1** Abra a torneira e molhe as mãos, evitando encostar na pia.

- 2** Aplique na palma da mão quantidade suficiente de sabonete líquido para cobrir todas as superfícies das mãos (seguir a quantidade recomendada pelo fabricante).

- 7** Esfregue o polegar direito, com o auxílio da palma da mão esquerda (e vice-versa), utilizando movimento circular.

- 8** Friccione as polpas digitais e unhas da mão esquerda contra a palma da mão direita, fechada em concha (e vice-versa), fazendo movimento circular.

Fonte: <http://www.ipsemg.mg.gov.br/ipsemg/ecp/images.do?evento=imagem&urlPlc=adesivo_higienizacao_das_maos_sabao.jpg>. Acesso em: 13 jun. 2016.

Além de conhecer os equipamentos, normas de segurança, higiene e limpeza, na rotina de um laboratório ainda se inclui o preparo dos meios de cultura que serão utilizados em procedimentos como isolamento e multiplicação de microrganismos.

Assim como todos os seres vivos, os microrganismos também necessitam de condições ambientais e nutrientes para que possam se desenvolver. Em vida livre, eles utilizam substratos e células animais e vegetais para obtenção desses nutrientes, entretanto, para que pudéssemos isolar e cultivar em laboratório, foi necessário o desenvolvimento de meios artificiais que contivessem esses nutrientes em concentrações adequadas ao desenvolvimento do microrganismo que desejamos cultivar.

Assim, os meios de cultura possuem a finalidade de cultivarmos *in vitro* fungos e bactérias de nosso interesse. Os vírus, como são parasitas intracelulares obrigatórios, e podem ser multiplicados em culturas de células que, por sua vez, são cultivadas utilizando-se os meios de cultura.

Os meios de cultura podem possuir diferentes tipos de consistência, sendo a forma líquida, sólida ou semissólida. Os meios de forma líquida são também chamados de líquidos ou caldos, e na maioria das vezes são utilizados para processos fermentativos. Os meios de forma sólida, por sua vez, são chamados de meios sólidos ou solidificados e podem possuir adição de agar-agar, que irá conferir uma aparência gelatinosa. Por fim, os meios de forma semissólida são chamados de semissólidos e possuem uma pequena quantidade de agar-agar. Esses meios são responsáveis por fornecer tanto condições nutricionais, que são os componentes do meio, quanto condições físico-químicas, como pH, para crescimento dos microrganismos.



Exemplificando

A produção de fungos entomopatogênicos em laboratórios e biofábricas pode ser realizada por fermentação ou utilizar-se de arroz pré-cozido como meio e substrato para seu crescimento. Neste caso, para fermentação o meio de cultura é líquido, já o arroz é considerado meio sólido.

Em ambos os casos, seja o meio líquido, sólido ou semi-sólido, o mesmo deve respeitar as necessidades nutricionais do microrganismo, que geralmente é uma fonte de carbono (C) e nitrogênio (N), bem como sais minerais. Geralmente, para as rotinas de multiplicação *in vitro* (em tubos de ensaio ou placas de Petri, por exemplo), utiliza-se meios sintéticos comerciais gelatinosos, contendo agar-agar.

A diversidade de fontes de C e N vem sendo bastante estudada para o desenvolvimento de meios de cultura complexos para produção de fungos e bactérias utilizadas no controle de pragas e doenças. Essas pesquisas visam proporcionar o crescimento do microrganismo em laboratório, mantendo sua virulência e aumentando sua produtividade nas biofábricas, fomentando assim a produção e uso de agentes de controle biológico no campo.

Assim, chegamos ao fim dessa primeira etapa de estudo sobre as rotinas em um laboratório de microbiologia agrícola. Na próxima seção conheceremos de maneira mais detalhada técnicas como

isolamento e repicagem de microrganismos, para que você seja capaz de realizá-las em um laboratório. Nos encontramos lá!

Sem medo de errar

Enfim, chegamos à unidade em que você aplicará todos os conhecimentos adquiridos até aqui nessa disciplina, a fim de estudar em laboratório, bem como isolar, identificar, multiplicar ou até mesmo produzir em larga escala microrganismos de interesse agrícola.

Para começar nosso estudo, você encarou um desafio profissional, sendo agrônomo responsável por um laboratório de microbiologia do solo. Logo na sua primeira semana de trabalho, você decidiu acompanhar todas as etapas de uma análise microbiológica do solo para que pudesse conhecer melhor os procedimentos e os colaboradores do laboratório.

A amostra que você irá acompanhar foi retirada na recepção e levada para o laboratório, a fim de começar as análises. Entretanto, antes de iniciar as análises, você procura pelo Procedimento Operacional Padrão, mas não encontra. Ao ver você procurando pelo POP, um dos estagiários o questiona: "mas o que é, exatamente, um POP? Por que é necessário consultá-lo antes de iniciar uma análise? Quem deve elaborar e validar? E agora, como você irá orientá-lo?"

Explique ao estagiário que todo laboratório deve possuir em suas dependências, um documento chamado Procedimento Operacional Padrão. Esse documento é comumente chamado de POP. Ele expressa as normas de segurança do local, a listagem e o funcionamento dos equipamentos, o planejamento de quaisquer trabalhos que possam ser executados, as instruções sequenciais das operações, além a frequência de execução de cada uma e tem como objetivo a padronização das operações e a minimização de erros na execução das tarefas, visando o funcionamento correto e a qualidade do processo.

No seu caso, como você pretende conhecer o laboratório e seus procedimentos, você sabe que é o POP que irá garantir que você realize as atividades de maneira padronizada, minimizando

as variações causadas por imprudência, diferentes entendimentos ou interpretações e adaptações aleatórias. O mesmo caso pode ser aplicado a quaisquer funcionários novatos ou antigos que não tenham certeza sobre a técnica a ser utilizada.

O POP deve descrever cada tarefa rotineira realizada pelo laboratório de maneira clara e objetiva para que não seja interpretada incorretamente pelo leitor. Sendo assim, a linguagem deve ser coerente com o grau de instrução dos colaboradores envolvidos nas tarefas. Ele deve ser elaborado por um profissional qualificado e experiente, devendo ser aprovado, assinado, datado e revisado anualmente ou conforme necessário pelo responsável técnico do laboratório. Além disso, deve-se traçar uma periodicidade para que o material passe por uma análise crítica. Nessa análise deve-se verificar a aplicabilidade dos procedimentos, se eles continuam sendo realizados e possíveis alterações que tenham sido realizadas na prática.

Agora, respondidas as dúvidas do estagiário, não deixe de listar os tópicos iniciais que devem estar contidos no POP do laboratório de microbiologia do solo em que trabalha, considerando os primeiros tópicos a se dominar em um laboratório, antes de iniciar qualquer tipo de trabalho.

Avançando na prática

De última hora

Descrição da situação-problema

Em uma rotina de laboratório, você precisa realizar um determinado procedimento que utilizará, vidrarias (Erlenmeyer e placas de Petri), utensílios metálicos (espátulas e alça de platina) e meio de cultura. Você se lembrou de esterilizar as vidrarias e o meio de cultura em autoclave, entretanto se esqueceu de colocar os utensílios metálicos no mesmo ciclo de esterilização. Agora você está atrasado para iniciar o procedimento e não possui todos os materiais estéreis os quais precisa. Quais seriam os métodos

de esterilização que você poderia utilizar para os materiais que faltaram? Qual seria o mais rápido?

Resolução da situação-problema

Você sabe que a esterilização é a eliminação de todas as formas de vida de determinado material, sejam elas células vegetativas ou esporos e que os materiais não esterilizados poderão provocar contaminação com microrganismos indesejados no procedimento que você irá realizar. Para a esterilização utiliza-se, majoritariamente processos físicos como calor úmido, calor seco, filtração e radiações. No seu caso, os utensílios metálicos poderiam ser esterilizados em autoclave, estufa ou ainda via flambagem. Destes três processos, o mais rápido é a flambagem, já que a autoclave irá demorar mais que 40 minutos e a estufa mais que três horas. Sendo assim, a melhor opção é aquecer a espátula e a alça direto na chama, eliminando os microrganismos indesejáveis.

Faça valer a pena

1. Analise os itens a seguir:

- I. Eliminação apenas das formas de vida vegetativas dos microrganismos, não eliminando necessariamente formas esporuladas.
- II. Impedimento da multiplicação microbiana, sem que necessariamente seja uma eliminação completa.
- III. Eliminação de todas as formas de vida de determinado material, sejam elas células vegetativas ou esporos.

Assinale a alternativa que apresenta a correta relação entre item e conceito de controle microbiano:

- a) I - Esterilização; II - Desinfestação; III - Assepsia.
- b) I - Assepsia; II - Desinfestação; III - Esterilização.
- c) I - Esterilização; II - Desinfecção; III - Assepsia.
- d) I - Desinfecção; II - Assepsia; III - Esterilização.
- e) I - Assepsia; II - Desinfecção; III - Esterilização.

2. Leia a descrição a seguir sobre dois diferentes métodos de esterilização de materiais:

A **autoclave** é um aparelho que utiliza o calor úmido juntamente com a pressão esterilização, garantindo que não sobre nenhum tipo de microrganismo nos itens. Já a **estufa** (ou **forno de Pasteur**) utiliza apenas o calor seco, mantendo a temperatura necessária para a secagem ou esterilização dos materiais. Em ambos os casos, fatores como temperatura e tempo de manutenção no equipamento serão fundamentais para o sucesso das atividades do laboratório.

Em relação a esses métodos, assinale a alternativa correta:

- a) Ambos são processos químicos, entretanto a autoclave é mais eficiente e rápida.
- b) Ambos são processos químicos, entretanto um tem como princípio o calor úmido enquanto o outro tem como princípio o calor seco.
- c) Ambos são processos físicos, entretanto a estufa (ou forno de Pasteur) não é utilizada para a esterilização de utensílios como alças, pinças e espátulas.
- d) Ambos são processos químicos, entretanto a estufa (ou forno de Pasteur) é mais eficiente e rápida.
- e) Ambos são processos físicos, entretanto a estufa (ou forno de Pasteur) não é utilizada para a esterilização de meios de cultura.

3. Analise as asserções a seguir e a relação proposta entre elas:

I. O objetivo do POP é descrever as atividades mais importantes do laboratório, pois são as que possuem um maior risco de erros, diferentes entendimentos ou interpretações e adaptações aleatórias.

PORQUE

II. Ele expressa as normas de segurança do local, a listagem e o funcionamento dos equipamentos, o planejamento de quaisquer trabalhos que possam ser executados, as instruções sequenciais das operações, além a frequência de execução de cada uma.

Assinale a alternativa que apresenta a correta relação entre as asserções apresentadas:

- a) As asserções I e II são verdadeiras e a II justifica a I.
- b) As asserções I e II são verdadeiras e a II não justifica a I.
- c) A asserção I é falsa e a II é verdadeira.
- d) A asserção I é verdadeira e a II é falsa.
- e) As asserções I e II são falsas.

Seção 4.2

Amostragens para análise microbiológica

Diálogo aberto

Olá, aluno! Chegamos a mais uma seção de estudo sobre práticas laboratoriais. Dentro das diferentes atividades de um laboratório de microbiologia, estão as análises e as investigações microbiológicas. Nesta seção, você perceberá que uma análise, seja ela qual for, não se inicia exatamente no laboratório, mas sim no momento da coleta da amostra, pois quando mal coletada, sem identificação ou mal acondicionada poderá colocar em risco a qualidade do resultado, que pode não ser condizente com a realidade. Para que você compreenda melhor o que estou falando, vamos retomar seu trabalho no laboratório de microbiologia do solo.

Lembre-se que na sua primeira semana de trabalho, você decidiu acompanhar todas as etapas de uma análise microbiológica do solo, do momento em que a amostra chega ao laboratório até a sua validação final e já identificou a necessidade de elaborar o Procedimento Operacional Padrão (POP) do local, que ainda não havia sido elaborado, mas esse não foi o único problema.

Após orientar o estagiário sobre o POP, você identifica que a amostra que você tem para analisar encontra-se mal acondicionada e sem identificação. Também não há como saber qual a profundidade do solo foi considerada na amostra. A única informação que você tem sobre ela é que o produtor solicitante havia adquirido novas áreas recentemente e desejava conhecer as condições em que o solo se encontra, solicitando uma análise microbiológica a vocês.

Como vocês estão sem o POP, não há como saber se há uma padronização de recebimento de amostras nem se os produtores são orientados sobre como as amostras devem ser coletadas, sejam elas de solo, plantas doentes, insetos mumificados, grãos armazenados ou produtos de origem animal, por exemplo. Pense em como você poderia resolver esse problema e padronizar o procedimento de coleta, recebimento e armazenamento das amostras. Por que essa

padronização é importante? Quais os cuidados devem ser tomados na coleta? E quais cuidados devem ser tomados no recebimento de uma amostra?

Nesta seção, você conhecerá as informações necessárias para responder a esses questionamentos e padronizar mais uma operação do laboratório que você está trabalhando. Ao final, você deverá orientar o produtor sobre a forma correta de coletar e identificar amostras de solo para que o resultado da análise da microbiota do solo reflita realmente a realidade em que a área se encontra. Vamos lá!

Não pode faltar

Dentro das atividades executadas por um laboratório de microbiologia estão as análises microbiológicas, que são comuns nas diferentes subáreas da microbiologia, as quais estudamos no começo dessa disciplina. Na área agrícola, em especial, essas análises e estudos nos permitem realizar a identificação de doenças em plantas, de agentes de controle biológico em insetos mumificados e da microbiota do solo, importantes para a produtividade do campo, por exemplo. Além disso, as análises microbiológicas nos permitem investigar possíveis contaminações em produtos agropecuários de origem animal e vegetal, como leite e derivados, carnes, peixes e grãos armazenados, como forma de controle de qualidade.



Refleta

Se estamos estudando uma disciplina de Microbiologia Agrícola, por que devemos conhecer sobre métodos de amostragens e procedimentos para recebimento de amostras nos laboratórios, além de apenas conhecer os procedimentos de análise?

De acordo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2018), o conceito de análise começa com a coleta da amostra. A amostra bem coletada, identificada e armazenada corretamente garante o sucesso da análise, levando em consideração que os procedimentos laboratoriais também sejam padronizados e executados de maneira correta.

Isso acontece porque o material obtido da amostra irá gerar o inoculante para as análises, ou seja, é o local em que extrairemos os microrganismos para inoculação e isolamento em meios de cultura específicos, que permitirão estudos microbiológicos e também a identificação do microrganismo de estudo. Por esse motivo o processo de amostragem no campo deve estar integrado com o laboratório, no sentido de inspeção e orientações sobre a melhor forma de se realizar a coleta da amostra, sua identificação e armazenamento.

Assim, como sendo essencial para a análise, é importante que os responsáveis pela coleta e recebimento das amostras em um laboratório, assegurem que elas se encontram em perfeito estado de acondicionamento, sendo os principais fatores: embalagem, temperatura (para o caso de amostras refrigeradas) e identificação. Além disso, é importante que o receptor da análise realize o cadastro do remetente, permitindo a rastreabilidade e confiabilidade documental, que também é de responsabilidade do laboratório.

De acordo com o MAPA (2018), para os produtos animais e vegetais destinados ao consumidor em embalagens, devem ser evitadas modificações, utilizando-se como amostra, a embalagem original na qual o produto é destinado ao consumidor (Figura 4.3), isso para evitar que as amostras coletadas especialmente para envio ao laboratório, sejam tendenciosas.

Figura 4.3 | Amostra de produto animal destinado ao consumidor em embalagens



Fonte: Mapa (2018, Anexo II).

Já para os produtos de origem animal e vegetal a granel, como carnes e grãos armazenados, em água de abastecimento, plantas doentes ou insetos moribundos, não se aplica essa orientação relacionada a embalagem, devendo as amostras serem encaminhadas ao laboratório em embalagens identificadas, limpas, sem perfurações, sem sinais de violação e/ou de vazamento ou rupturas (MAPA, 2018). Os laboratórios geralmente disponibilizam embalagens específicas para cada tipo de coleta, que pode ser saco de polietileno para coleta de solos e grãos, saco de papel para coleta de folhas ou pote plástico estéril para coleta de água, por exemplo.

Quando as amostras exigirem condições específicas de armazenamento, como a temperatura de acondicionamento (para se manterem resfriadas ou congeladas), estas devem ser acondicionadas em caixas de isopor ou caixas plásticas térmicas, desde que estejam em condições adequadas de higiene e que confirmem a conservação da amostra. De acordo com a necessidade, as amostras podem ainda ser acompanhadas de gelo reciclável ou outra substância refrigerante. De acordo com o MAPA (2018) deve-se evitar acondicionar gelo juntamente com os produtos pois pode haver o rompimento das embalagens no recebimento e consequente perda da amostra.

Para as amostras congeladas ou refrigeradas, é importante considerar que o tempo decorrido entre a coleta da amostra e sua chegada ao laboratório seja o menor possível e, nesse sentido, é importante evitar a estocagem do material a ser analisado antes da entrega no laboratório.

Para os produtos congelados, ao chegar no laboratório, o responsável pelo recebimento deve avaliar se as amostras encontram-se totalmente sólidas, anotando a condição de recebimento delas. Amostras de produtos congelados que estiverem fora destas condições, ou seja, descongeladas, devem ser descartadas (MAPA, 2018). Já para os produtos resfriados, o responsável pelo recebimento da amostra deve aferir a temperatura em que ela se encontra e observar se está em estado de conservação adequado conforme informação do rótulo (se possuir) ou se está entre 2 a 8 °C (MAPA, 2018). Quaisquer amostras que não estiverem em suas condições ideais de temperatura devem ser descartadas.



Exemplificando

Você consegue citar exemplos de quais poderiam ser amostras que precisariam ser mantidas congeladas ou refrigeradas? Veja alguns exemplos:

Congelados: produtos comercializados congelados como carnes, peixes e alguns embutidos.

Resfriados: leite cru, solo, tecidos vegetais, agentes microbianos de controle biológico.

Em relação à identificação é importante salientar que todas as amostras devem receber identificação legível e sem teor ambíguo para que seja entregue ao laboratório. A identificação da amostra deve ser registrada pelo responsável pelo recebimento em formulário específico ou em sistema apropriado com data e horário do recebimento.

Sobre o recebimento das amostras é importante ressaltar que, caso o laboratório realize análises microbiológicas e físico-químicas, é necessário que elas estejam em envoltórios separados. Além disso, cada amostra deve ter sua própria documentação, distinta para cada propósito.

Caso as amostras se encontrem em conformidade com os critérios estabelecidos pelo laboratório, estas devem ser encaminhadas para análise, se possível com codificação interna, mantendo-se a rastreabilidade do processo até a emissão do laudo microbiológico. Entretanto, caso as amostras sejam consideradas fora de conformidade no momento do recebimento, elas deverão ser negadas e descartadas.



Assimile

As amostras recebidas pelo laboratório devem ser avaliadas ainda na recepção antes de serem aceitas, de acordo com os critérios estabelecidos. De maneira geral, de acordo com o MAPA (2018), as amostras devem:

- Estar devidamente lacradas e sem sinais de violação.

- Estar acomodadas em embalagens adequada conforme seu tipo.
- Estar em estado de conservação aceitável, principalmente para o caso de produtos congelados e resfriados.
- Estar dentro do prazo de validade para os casos de produtos direcionados ao consumidor final, e em embalagem original.
- Estar em quantidade suficiente.
- Estar com a identificação adequada.

Além das condições de embalagem, temperatura e identificação, é preciso considerar uma quantidade mínima para amostragem, pensando no preparo da análise. No Quadro 4.2 temos um exemplo de algumas quantidades indicadas pelo MAPA para análises microbiológicas em água e alimentos, veja:

Quadro 4.2 | Quantidades indicadas para amostras de água e alimentos

Matriz	Quantidade mínima	Observação
Água de abastecimento	300 mL (frasco)	Serão encaminhadas em frascos específicos (com tiosulfato de sódio) fornecidos pelos laboratórios, capacidade de no mínimo 300 mL, devendo, preferencialmente, ser preenchido com 2/3 do volume.
Gelo	500 g	-----
Amostra de alimentos em geral	500 g ou mL	-----
Produtos de alto valor agregado como geleia real e queijos finos	-----	Serão enviadas amostra com menor massa, de acordo com o número de ensaios a serem realizados, desde que previamente acordado com o laboratório.
Produtos comercialmente estéreis	3 unidades	Independente de sua massa. 3 unidades do mesmo lote de produção.

Frango PRP	1 carcaça	Independente de massa.
Leite UHT e creme de leite UHT	2 unidades	Independente de massa. 2 unidades do mesmo lote de produção.
Ovos	12 unidades ou 24	12 ou 24 unidades do mesmo lote na embalagem original, conforme tamanho do ovo.

Fonte: Mapa (2018, Anexo I).



Pesquise mais

Quer conhecer mais sobre as quantidades mínimas de amostragem de produtos agropecuários bem como o estado de conservação ideal para cada uma? Consulte a Tabela 2 (p. 21-26) do manual de coleta de amostras da Fundação Ezequiel Dias indicado abaixo. Nessa tabela você encontrará diferentes tipos de alimentos analisados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), inclusive produtos de origem animal e vegetal.

FUNED. **Manual de coleta de amostras**. Belo Horizonte, 2018. Disponível em: <<http://www.funed.mg.gov.br/wp-content/uploads/2011/07/DIOM-DIVISA-SGA-MQ-0001-MANUAL-DE-COLETA-DE-AMOSTRAS.pdf>>. Acesso em: 22 jun. 2018.

Você pode estar se perguntando sobre a quantidade adequada da amostra para a análise microbiológica de solo, de vegetais doentes e de insetos mumificados, não é mesmo? Para a análise de solo, respeitar apenas a quantidade não é suficiente para uma investigação criteriosa. A amostra também precisa ter sido coletada da maneira correta, utilizando instrumentos higienizados e respeitando a profundidade onde a matéria orgânica e a biomassa microbiana serão encontradas. O procedimento para coleta de amostra de solo para análise microbiológica é bem parecido com a amostragem para análises físico-químicas de fertilidade, que você já pode ter estudado anteriormente ou já ter realizado em algum momento de sua vida, entretanto com algumas peculiaridades. Vamos conhecer?

De acordo com o Departamento de Ciência do Solo da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ, 2003), para

a determinação de microbiota do solo é essencial que a coleta das amostras de solo seja realizada utilizando-se instrumentos esterilizados ou desinfestados (você já estudou técnicas de esterilização e desinfecção na seção anterior). Além disso, a terra deve ser acondicionada em sacos plásticos, conservando-se sua umidade natural e mantendo-a refrigerada até a entrega no laboratório, preferencialmente dentro de 24 horas ou o mais rápido possível (ESALQ, 2003).

A propriedade deve ser dividida em áreas ou glebas uniformes, devidamente identificadas. Pode-se, inclusive, marcar os pontos de retirada das amostras utilizando um GPS, por exemplo. A amostragem deverá ser realizada caminhando em zigue-zague de forma a percorrer toda a área ao acaso, onde as porções de solo serão coletadas (ESALQ, 2003; IAC [s/d]). Ainda segundo a ESALQ (2003), o solo deve ser retirado em duas profundidades: 0-20 cm e 20-40 cm ou ainda entre 0-25 cm e 25-50 cm. Antes de acondicionar o solo no saquinho de amostragem, geralmente cedido pelo laboratório, o solo coletado em cada uma das amostras – chamadas sub-amostras –, deverá ser colocado em um recipiente higienizado. Deve-se homogeneizar a amostra composta pelas sub-amostras e coletar entre 300 e 500g que será a amostra (ESALQ, 2003; IAC [s/d]). As ferramentas mais utilizadas para amostragem de solo são sondas e trados, principalmente o trado holandês (Figura 4.4).

Figura 4.4 | Ferramentas mais utilizadas para amostragem de solo (A) exemplo de sonda e (B) exemplo de trado holandês



Fonte: adaptada de <<http://www.sondaterra.com/categoria-48-Amostradores%20de%20Solo.xhtml>>. Acesso em: 17 set. 2018.

Já para a coleta de amostras de tecidos vegetais como folhas, raízes e outras partes de plantas doentes, segundo o Departamento de Ciência do solo da ESALQ (2003) elas devem ser lavadas com água corrente e deixadas para uma breve secagem à sombra. Quando estiverem secas, acondicionar nos saquinhos fornecidos pelo laboratório e manter em geladeira até o momento da entrega.

As amostras de grãos armazenados, por sua vez, podem verificar a presença de fungos responsáveis pela contaminação do alimento por micotoxinas, além de verificar a ocorrência de insetos e roedores, por exemplo. Esse tipo de amostra deve ser coletada em diferentes profundidades do armazém onde se encontra ou do caminhão em que estão sendo transportados. Isso porque, geralmente, os grãos da parte superior do caminhão podem ter sofrido influência de ventos, chuva ou sol, por exemplo. Além disso, os grãos do fundo possuem uma quantidade maior de impurezas. As amostras retiradas de um lote devem ser colocadas em um mesmo recipiente higienizado, homogêneas e retirada uma parte que será enviada ao laboratório para análise. É importante evitar exposição a variações de temperatura e umidade da amostra durante o transporte.



Pesquise mais

Para as amostras de tecidos vegetais há uma recomendação para cada tipo de cultura que você pode conhecer e pesquisar sempre que precisar no link abaixo. Nele você encontra instruções para amostragem tanto de solo quanto de tecidos vegetais!

Departamento de Ciência do Solo – ESALQ/USP. **Instruções para coleta e remessa de amostras.** Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/departamentos/lso/coleta.htm>>. Acesso em: 24 jun. 2018.

Para conhecer o procedimento de coleta de amostras de grãos, você pode acessar material disponibilizado pelo departamento de Fitossanidade, engenharia rural e solos da Unesp (campus Ilha Solteira):

LEITE, M. A. **Armazenamento e beneficiamento de grãos: amostragem dos grãos.** Disponível em: <https://wp.ufpel.edu.br/nutricaoanimal/files/2011/04/Amostragem_gr%C3%A3os.pdf>. Acesso em: 24 jun. 2018.

Assim, chegamos ao final de mais uma seção, rumo ao final também desta disciplina de Microbiologia Agrícola. A partir de agora espera-se que você tenha outra visão sobre as análises microbiológicas no contexto agrícola e passe a enxergá-las de maneira muito mais abrangente, uma vez que se fazem importantes para a análise da microbiota e da fertilidade do solo, como também para a realização de controle de qualidade e da fitossanidade de produtos animais e vegetais. Vamos em frente!

Sem medo de errar

Nessa seção, você conheceu a importância das amostragens para o sucesso de uma análise microbiológica, quais as melhores práticas para coleta, acondicionamento e identificação, além dos cuidados que o receptor da amostra no laboratório deve ter para garantir que ela se encontra em bom estado, não é mesmo? Sendo assim, estamos preparados para que você possa resolver o problema em que se encontra em sua vida profissional.

Você agora é o agrônomo responsável por um laboratório de microbiologia agrícola e decidiu acompanhar todas as etapas de uma análise microbiológica do solo. Você identificou que a amostra a ser analisada encontra-se mal acondicionada e sem identificação. Também não há como saber qual a profundidade do solo foi considerada na amostra. Outro problema é que, como vocês estão sem o POP, não há como saber se há uma padronização de recebimento de amostras nem se os produtores são orientados sobre como as amostras devem ser coletadas. E agora, por que essa padronização é importante? Quais os cuidados devem ser tomados na coleta? E quais cuidados devem ser tomados no recebimento de uma amostra?

A padronização dos procedimentos e a orientação dos produtores sobre a melhor maneira de se realizar amostragens que serão enviadas ao laboratório são importantes pois, uma amostra bem coletada, identificada e armazenada corretamente poderá garantir o sucesso da análise, juntamente com os procedimentos laboratoriais que devem ser executados de maneira padrão. Nesse sentido, é importante que o processo de amostragem no campo

esteja integrado com o laboratório, no sentido de inspeção e orientações sobre a melhor forma de se realizar a coleta da amostra, sua identificação e armazenamento.

Para as amostras de produtos animais e vegetais destinados ao consumidor em embalagens, devem ser evitadas modificações, utilizando-se como amostra, a embalagem original na qual o produto é destinado ao consumidor. Já para os produtos de origem animal e vegetal a granel, água de abastecimento, plantas doentes ou insetos moribundos, essa orientação relacionada à embalagem não se aplica, devendo as amostras serem encaminhadas ao laboratório em embalagens identificadas, limpas, sem perfurações, sem sinais de violação e sem sinais de vazamento ou rupturas.

Quando as amostras exigirem temperatura de acondicionamento específica, elas devem ser acondicionadas em caixas de isopor ou caixas plásticas térmicas em condições adequadas de higiene e que confirmam a conservação da amostra. De acordo com a necessidade, as amostras podem ainda ser acompanhadas de gelo reciclável ou outra substância refrigerante, entretanto deve-se evitar acondicionar gelo juntamente com os produtos, pois pode haver o rompimento das embalagens no recebimento e consequente perda da amostra. Além disso, para as amostras congeladas ou refrigeradas, é importante considerar que o tempo entre sua coleta da amostra e sua chegada ao laboratório seja o mais rápido possível.

Para a determinação de microbiota do solo, análise que você irá realizar, é essencial que a coleta das amostras de solo seja realizada utilizando-se instrumentos esterilizados ou desinfestados. Além disso, a amostra deve ser acondicionada em sacos plásticos conservando-se sua umidade natural e conservada refrigerada até a entrega no laboratório, preferencialmente dentro de 24 horas ou o mais rápido possível.

Outras informações importantes é que a amostragem deverá ser realizada caminhando em zigue-zague, em que o solo deve ser retirado em duas profundidades: 0-20 cm e 20-40 cm ou ainda entre 0-25 cm e 25-50 cm, que é a faixa em que a matéria orgânica e os microrganismos podem ser encontrados. Antes de acondicionar o solo no saquinho de amostragem o solo deverá ser colocado em

um recipiente higienizado, homogeneizar a amostra composta e coletar entre 300 e 500 g que será a amostra final.

Ao chegar no laboratório, é importante que os responsáveis pela coleta e recebimento das amostras, assegurem-se que elas se encontram em perfeito estado de acondicionamento, considerando a embalagem, a temperatura para o caso das amostras refrigeradas e a identificação. Além disso, é importante que o receptor da análise realize o cadastro do remetente, permitindo a rastreabilidade e confiabilidade documental, que também é de responsabilidade do laboratório.

De maneira geral, o responsável pelo recebimento das amostras deve analisar se elas estão devidamente lacradas e sem sinais de violação, se estão acomodadas em embalagens adequada conforme seu tipo, se estão em estado de conservação aceitável – principalmente para o caso de produtos congelados e resfriados –, se estão dentro do prazo de validade – para os casos de produtos direcionados ao consumidor final em embalagem original –, se estão em quantidade suficiente e se possuem identificação adequada.

Agora que você já conhece os procedimentos de amostragem e recebimento, não deixe de orientar o produtor sobre a forma correta de coletar e identificar amostras de solo para que o resultado da análise da microbiota do solo reflita realmente a realidade em que a área se encontra. Vamos lá!

Avançando na prática

Evitando toxinas em amendoim

Descrição da situação-problema

Agora você vem trabalhando em uma cooperativa em que os produtores são focados em milho e amendoim. Além da produção no campo, você também coordena as atividades de armazenamento, fazendo visitas periódicas nos armazéns graneleiros para buscar as amostras de grãos e levar ao laboratório. Você solicita aos funcionários do armazém coletas mensais, pois sabe que as análises

microbiológicas dos grãos armazenados são essenciais para o controle de qualidade dos produtos, por meio da identificação de fungos e da contaminação com micotoxinas produzidas por eles, que podem ser prejudiciais para o ser humano.

Suas últimas amostras não foram aceitas pelo laboratório, pois, segundo o responsável, estavam fora dos padrões de recebimento por não estarem devidamente acondicionadas em saquinhos plásticos, os grãos estarem molhados e não possuíam identificação. Você sabe que as amostras não deveriam ter sido acondicionadas desta maneira, mas desta vez não conferiu ao pegar a caixa de isopor no armazém. Quais orientações você daria aos funcionários do armazém para uma próxima coleta? Como explicar para eles a importância desse trabalho?

Resolução da situação-problema

Para que as amostras de grãos armazenados não sejam mais recusadas pelo laboratório, é importante orientar os funcionários que realizam a coleta que as amostras vegetais devem ser acondicionadas secas nos saquinhos fornecidos pelo laboratório. Os saquinhos devem estar higienizados, assim como os instrumentos utilizados para a coleta e não possuírem variações extremas de temperatura e umidade durante o percurso. Além disso, deve-se identificar as amostras corretamente. Oriente os funcionários do armazém, ainda que o processo de amostragem no campo seja importante, pois garante o sucesso da análise e, conseqüentemente, atesta a qualidade do produto.

Faça valer a pena

1. Para a determinação de microbiota do solo é essencial que a coleta das amostras de solo seja realizada utilizando-se instrumentos esterilizados ou desinfestados. Além disso, a terra deve ser acondicionada em sacos plásticos conservando-se sua umidade natural e conservada refrigerada até a entrega no laboratório, preferencialmente dentro de 24 horas ou o mais rápido possível.

São instrumentos utilizados para a amostragem de solo:

- a) Enxada ou pá reta.
- b) Trado holandês ou enxada.
- c) Trado de rosca ou pá reta.
- d) Sonda ou enxada.
- e) Sonda ou trado holandês.

2. “As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos, que se desenvolvem naturalmente em alimentos como amendoim, milho, feijão, arroz e trigo e podem causar micotoxicoses, razão pela qual é importante compreender seus mecanismos de ação e desenvolver métodos de prevenção e controle”. (SAKATA; SOUZA; MAIA, 2011)

Para o controle de micotoxinas, amostragem em grãos armazenados e análises microbiológicas são importantes, entretanto, alguns cuidados devem ser tomados, como:

- a) Manter as amostras congeladas em estado rígido até o momento da entrega no laboratório.
- b) Evitar exposição a variações de temperatura e umidade durante o transporte.
- c) Manter as amostras em ambiente escuro pois não pode haver interferência de raios ultravioleta
- d) Lavar os grãos e acondicioná-los ainda úmidos em sacos de polietileno.
- e) Lavar e secar os grãos à sombra, antes de acondicioná-los em sacos de polietileno.

3. Suponha que você seja o receptor responsável pelo recebimento e análise os seguintes grupos de amostras, descritos a seguir:

- I. Produtos comercializados congelados como carnes, peixes e alguns embutidos.
- II. Leite cru, solo, tecidos vegetais, agentes microbianos de controle biológico.

Para cada um desses itens, a recomendação de recebimento no laboratório é que:

- a) I. avaliar se as embalagens estão dentro do prazo de validade esperado; II. Avaliar se as embalagens não possuem furos ou violação.
- b) I. Avaliar se as amostras encontram-se totalmente sólidas; II. Aferir a temperatura e verificar se ela se encontra entre 2 e 8 °C.

- c) I. Avaliar se as embalagens não possuem furos ou violação; II. Avaliar se as embalagens estão dentro do prazo de validade esperado.
- d) I. Aferir a temperatura e verificar se ela se encontra entre 2 e 8 °C; II. Avaliar se as amostras encontram-se totalmente sólidas.
- e) I. Avaliar se as embalagens estão devidamente identificadas; II. Avaliar se as embalagens não possuem furos ou violação.

Seção 4.3

Isolamento e caracterização de microrganismos

Diálogo aberto

Olá, aluno! Chegamos ao final da nossa última unidade da disciplina de Microbiologia Agrícola. Foram muitas informações até aqui, não é mesmo? Mas ainda não acabou, pois precisamos conhecer, antes de finalizar, como são realizados procedimentos de semeadura, repicagem e caracterização dos microrganismos, a fim de que você seja capaz de diferenciar aqueles que estiverem presentes em uma determinada amostra vegetal, animal ou de solo, por exemplo.

Para isso, lembre-se que você foi contratado como agrônomo responsável por um laboratório de microbiologia do solo. Dentre suas funções, estão coordenar as pesquisas em andamento, as atividades gerais do laboratório, treinar e acompanhar estagiários, bolsistas e novos funcionários, além de validar todas as análises realizadas, realizando recomendação técnica quando necessário. Logo na sua primeira semana de trabalho, você decidiu acompanhar todas as etapas de uma análise microbiológica do solo, o que lhe possibilitou verificar que o local não possuía um Procedimento Operacional Padrão (POP), inclusive em relação à coleta e recebimento das amostras que vão para análise.

Após ter orientado o produtor sobre a correta realização da amostragem de solo, uma nova amostra chega ao laboratório em condições adequadas e você, enfim, acompanha o técnico na avaliação de microbiota do solo que ele irá realizar. Como você está em fase de criação do POP, decide analisar detalhadamente todas as etapas realizadas por ele e percebe que, além de pouco experiente, possui alguns “vícios” da rotina do dia a dia e você precisará solucionar esses pequenos detalhes, sanando as dúvidas que surgirem, pois, assim, chegarão a um procedimento comum que possa ser utilizado por todos. Algumas dúvidas são: “Por que é necessário realizar diluições seriadas para a realização de procedimentos como a semeadura

e isolamento? É realmente necessário flambar os instrumentos de semeadura e repicagem a cada movimento? E por que não podemos confiar apenas na análise macroscópica da colônia para identificação de um determinado microrganismo?”

Para lhe ajudar a responder os questionamentos do técnico, bem como redigir detalhadamente os procedimentos realizados, nessa seção você irá conhecer como realizam-se as diluições da amostra, quais os tipos de semeadura e quando utilizar cada um deles, como obter uma cultura pura por meio do isolamento dos microrganismos e ainda as características morfológicas de fungos e bactérias, para que você possa diferenciar os tipos de colônias.

Ao final, você deverá redigir os procedimentos realizados, juntamente com as instruções relacionadas às amostragens e às normas de segurança do laboratório já elencadas. Mãos à obra!

Não pode faltar

O isolamento de um microrganismo se trata do processo realizado para a obtenção de uma cultura pura. Essa cultura é assim chamada pois foi isolada de um único microrganismo que foi separado de outros encontrados em uma determinada amostra. Isso quer dizer que, após a amostragem e constatação de diferentes microrganismos presentes no material analisado, isola-se um único espécime a fim de gerar uma colônia, geneticamente idêntica e sem interferência de outros microrganismos.



Refleta

O isolamento microbiano pode parecer uma técnica complexa, não é mesmo? Agora reflita com tudo que você estudou desde o início dessa disciplina até aqui: qual seria a finalidade de realizar isolamento de microrganismos em laboratório?

Nem toda análise microbiológica laboratorial irá gerar um isolamento, entretanto, em estudos mais específicos, essa técnica permite a identificação e classificação dos microrganismos, além da observação de suas características morfológicas. Assim, apenas uma colônia

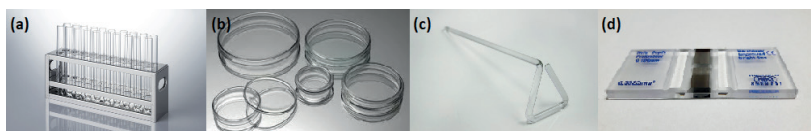
pura permitirá a análise de características genéticas, bioquímicas e de patogenicidade, por exemplo.

Mas, para chegarmos ao isolamento de um microrganismo, precisamos entender algumas técnicas básicas de semeadura e repicagem, que o auxiliarão desde as análises mais simples até as mais complexas. A semeadura refere-se à inoculação de microrganismos em um meio de cultura, partindo-se de um material contaminado (amostras). Já o repique ou repicagem é o ato de realizar a transferência de um microrganismo de uma cultura para outra. Isso pode ser realizado para evitar o esgotamento nutricional do microrganismo no meio em que se encontra, para evitar o acúmulo de metabólitos tóxicos no meio, ou ainda para se multiplicar o microrganismo.

Assim, uma análise ou investigação microbiológica se iniciará com a semeadura dos organismos presentes na amostra. Essa semeadura resultará no crescimento de colônias de diferentes espécies. Caso se deseje estudar uma delas, será necessário realizar repicagens para obtenção da cultura pura, separando tal colônia das demais.

Para esses trabalhos, além dos equipamentos de esterilização já estudados nesta unidade, você precisará utilizar alguns materiais de laboratório como, por exemplo, tubos de ensaio, placas de Petri, alça/agulha de níquel-cromo ou alça de platina, alça de Drigalski, pipetas, contador manual de colônias, câmara de Neubauer, agitador de tubos e balança analítica. Você pode se familiarizar com alguns desses materiais nas figuras a seguir.

Figura 4.5 | Vidrarias mais utilizadas em análises e isolamento microbiano. (a) Tubos de ensaio; (b) Placas de Petri; (c) Alça de Drigalski; (d) Câmara de Neubauer



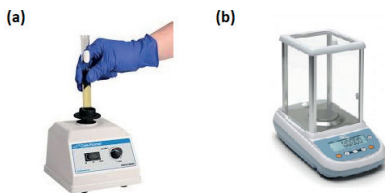
Fonte: elaborada pela autora.

Figura 4.6 | Instrumentos mais utilizados em análises e isolamento microbiano. (a) Micropipeta; (b) Contador de células e colônias; (c) Alça/agulha de níquel-cromo ou platina; (d) bico de Bunsen



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 4.7 | Equipamentos mais utilizados em análises e isolamento microbiano. (a) Agitador de tubos; (b) Balança analítica



Fonte: elaborada pela autora.

Continuando com nosso estudo, dependendo da amostra que se pretende avaliar, será necessária a realização de diluições sucessivas para a semeadura. Se considerarmos que cada propágulo (células, esporos ou hifas) originará uma colônia sobre o meio de cultivo, quando a concentração de microrganismos semeados/inoculados for muito grande, o crescimento de colônias ocorrerá de maneira sobreposta, impossibilitando sua análise, isolamento ou contagem.



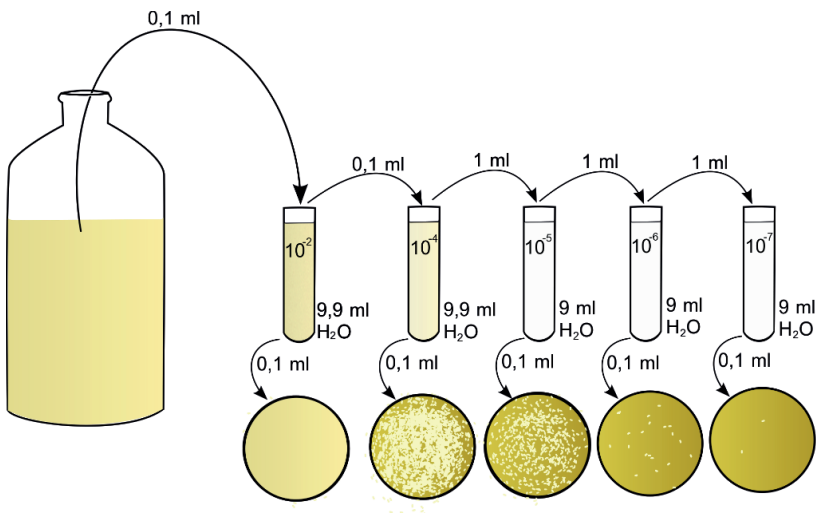
Exemplificando

Ao se trabalhar com amostras puras ou muito concentradas, a quantidade de microrganismos será tanta no meio de cultura que certamente você não conseguirá quantificá-los, separá-los ou identificá-los. Dessa forma, é necessário utilizarmos diluições para realizar a semeadura e isolamento de microrganismos do solo, de grãos armazenados e exsudados de tecido vegetal. Além disso, as diluições são necessárias ainda quando desejamos quantificar microrganismos por meio da contagem de colônias ou propágulos (como esporos, células e hifas).

Assim, chamamos de diluição seriada a técnica que nos permite a diminuição do número de microrganismos de amostras muito concentradas. Ela é baseada em um procedimento de diluição simples em que a amostra para diluição de cada etapa é coletada da diluição anterior. Vamos entender o procedimento com mais detalhes: Antes de iniciar a diluição, prepare-se tubos de ensaio contendo 9 mL do líquido a ser utilizado na diluição, que pode ser água destilada ou solução salina, por exemplo, dependendo do microrganismo que se deseja estudar. Posteriormente, sua amostra não diluída deve ser pipetada (geralmente 0,1 ou 1 mL)

e adicionada ao primeiro tubo, homogeneizando-a no agitador de tubos. O processo deve ser repedido em série nos tubos seguintes de forma que cada um contenha uma diluição de dez vezes do tubo não diluído (1:10; 1:100; 1:1000...). Veja o esquema na Figura 4.8 e note que a concentração de microrganismos nas placas de Petri contendo meio de cultura vão diminuindo conforme as diluições avançam.

Figura 4.8 | Diluição seriada e o crescimento microbiano em cada etapa



Fonte: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/94/Verd%C3%BCnnungsreihe_mit_Ausplattieren.svg/2000px-Verd%C3%BCnnungsreihe_mit_Ausplattieren.svg.png>. Acesso em: 7 jul. 2018.

Após realizadas as diluições, chega-se o momento de proceder com a semeadura ou inoculação, que poderá ocorrer em tubos de ensaio, placas de Petri, meios sólidos ou líquidos, dependendo o tipo de microrganismo e o objetivo da análise ou estudo que se deseja realizar.

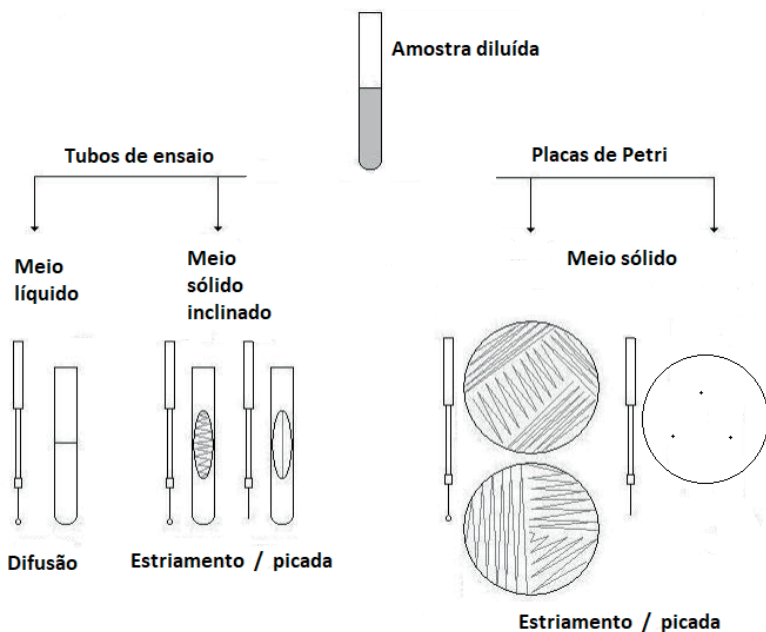
Nos tubos de ensaios a semeadura poderá ser realizada em meio líquido, via difusão ou em meio sólido inclinado, via esgotamento de alça ou via picada. Chamamos de **esgotamento de alça** ou **estriamento**, a técnica em que a distribuição da amostra é realizada espalhando-se com alça de níquel-cromo ou platina (ponta em forma de alça) sobre o meio de cultura inclinado no tubo. Geralmente, essa distribuição é feita da base do meio de cultura para a extremidade do mesmo. A **picada**, por sua vez, é realizada com o auxílio de uma

agulha de semeadura (ponta em forma de agulha), realizando um breve toque sobre o meio de cultura (Figura 4.9).

Já nas placas de Petri, podemos realizar a semeadura via estrias múltiplas, picada ou espalhamento com alça de Drigalski. Para a semeadura em placas, é importante considerar que o material contenha poucos microrganismos e, nesse sentido, as diluições são essenciais.

De maneira bem semelhante ao estriamento realizado em tubos de ensaio, o método de **estrias múltiplas** em placas de Petri, consiste em espalhar o material com o auxílio de uma alça de níquel-cromo ou platina, estriando sucessivamente até o esgotamento do material, podendo ser realizada em apenas um sentido ou em vários. Essa técnica tem como objetivo o isolamento bacteriano. Já a **picada** geralmente é realizada para transferência de colônias de meios de cultura (repicagem), utilizando-se agulha de níquel-cromo ou platina que deve tocar o propágulo de uma colônia e tocar levemente o meio de cultura em que o material deverá se desenvolver (Figura 4.9).

Figura 4.9 | Tipos de semeadura em tubos e placas



Fonte: elaborada pela autora (2018).

Existe ainda um método alternativo, para caso se deseje obter um filme uniforme de crescimento microbiano ou ainda colônias isoladas após a diluição, deve-se utilizar o método denominado **espalhamento**. Esse método consiste em espalhar o material resultante da diluição com o auxílio de um swab ou alça de Drigalski distribuindo a amostra por toda a superfície da placa de Petri a ser utilizada nesta técnica.

Os procedimentos de semeadura e repicagem devem ser realizados em capela de fluxo laminar, em ambiente estéril para que não exista contaminação da amostra ou do operador. É importante ainda, que a cada procedimento realizado, a alça ou agulha seja flambada utilizando o bico de Bunsen, para evitar quaisquer riscos de contaminação. A alça deve ser flambada na posição vertical e ficar atrás da chama para que não exista nenhum risco de acidente com o operador.

Quando o procedimento for realizado com tubos de ensaio, é importante retirar a rolha e flambar a boca do tubo, sempre mantendo a rolha segura com o dedo mínimo até o final da semeadura.

A rolha não deve descansar sob a bancada da capela, assim como os instrumentos, que devem ser repousados em bécker de vidro contendo álcool 70% antes da flambagem.



Assimile

Sempre após quaisquer procedimentos de semeadura e repicagem, o material deve ser incubado conforme necessidades específicas de temperatura, luminosidade e umidade do microrganismo, geralmente utilizando-se uma incubadora do tipo B.O.D. (Demanda Bioquímica de Oxigênio).

Além da semeadura ou repicagem em tubos e placas, ela poderá ser realizada ainda em outros tipos de meios que não aqueles baseados em ágar. Um exemplo é a semeadura de fungos entomopatogênicos, que utilizam arroz pré-cozido como meio de cultura e substrato para sua produção em biofábricas. Neste caso, a semeadura, chamada de inoculação, é realizada retirando-se uma alíquota do microrganismo (inóculo) e

inoculando com pipeta em saquinho de polipropileno contendo o arroz umedecido e autoclavado.



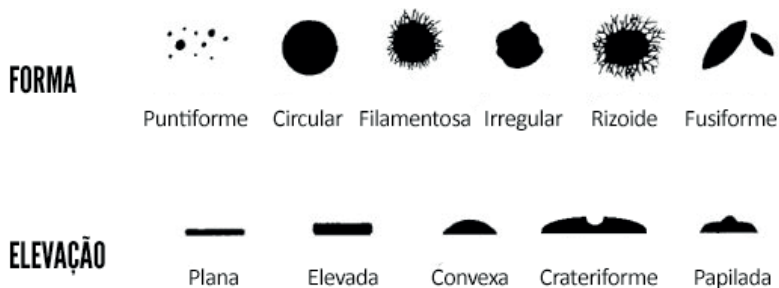
Refleta

Se um determinado organismo foi semeado e multiplicado em laboratório, significa que ele já está isolado?

Para a realização do isolamento de um microrganismo, obtendo-o em uma cultura pura, é necessário, primeiro, que ele tenha se desenvolvido em placa de Petri contendo meio de cultura. Isso será possível por meio das técnicas que você acabou de estudar. Quando você estiver em posse das colônias desenvolvidas, é o momento de analisar macro e microscopicamente as características do microrganismo.

Macroscopicamente falando, devemos analisar a morfologia da colônia e registrar a forma, o tamanho, a cor, se há elevações e como são as bordas das colônias desenvolvidas. Essa análise é fundamental para a identificação das características do microrganismo que se pretende isolar ou identificar, fazendo parte de sua caracterização. Além disso, quando uma placa de Petri possuir diferentes colônias, como é o caso das culturas de amostras de solo, é importante anotar quantos tipos de colônias se desenvolveram e as características morfológicas de cada uma. De acordo com Câmara (2013), as colônias podem ser classificadas e descritas basicamente por meio de critérios como forma, elevação e margem, conforme demonstra a Figura 4.10:

Figura 4.10 | Morfologia de colônias de acordo com forma, elevação e margem



MARGEM



Inteira



Ondulada



Lobulada



Filamentosa



Espiral

Fonte: <<https://www.biomedicinapadiao.com.br/2013/08/descricao-morfologica-de-colonias-em.html>>. Acesso em: 4 jul. 2018.

Após a análise macroscópica da colônia, uma análise microscópica da espécie de cada colônia também se faz necessária, a fim de identificar ou descrever o microrganismo. Para fungos filamentosos, muitas vezes é possível identificar até nível de gênero, de acordo com as estruturas de reprodução. É importante citar que, por mais que alguns microrganismos mais conhecidos por você possam ser identificados por características morfológicas, apenas uma investigação a nível molecular poderá confirmar qual é a espécie que está sendo analisada e isolada.

Outra análise que pode ser realizada, para o caso de bactérias, é a coloração de Gram. Já vimos que essa coloração classifica as bactérias como Gram-positivas ou Gram-negativas, de acordo com seu tipo de membrana celular, você se lembra? Agora vamos conhecer o procedimento.

O primeiro passo é realizar o preparo do esfregaço na lâmina de vidro que será levada ao microscópio. Flambe-a rapidamente na chama do bico de Bunsen para retirar quaisquer possíveis microrganismos que estejam ali localizados e identifique com marcador para retroprojeter o lado da lâmina onde o esfregaço da colônia bacteriana será colocado. Flambe a alça de níquel-cromo ou platina e deixe-a esfriar antes de retirar a amostra da colônia da placa de Petri. Enquanto isso, coloque sobre a lâmina uma gota de solução salina fisiológica. Abra a placa contendo a cultura bacteriana e toque a colônia escolhida com a alça de níquel-cromo ou platina, retirando uma pequena amostra. Esfregue o material na lâmina, fazendo movimentos de rotação a fim de se obter um esfregaço oval, fino e uniforme. Seque e fixe a lâmina passando o lado oposto ao esfregaço pela chama do bico de Bunsen rapidamente.

Após o preparo do esfregaço, chegou a hora de realizar a coloração. Para isso, cubra a lâmina com solução cristal violeta

e aguarde um minuto. Lave rapidamente em água destilada e cubra-a com solução de lugol por um minuto. Novamente lave-a rapidamente com água destilada, incline-a e goteje álcool-acetona ou álcool absoluto por cerca de 15 segundos. Lave novamente a lâmina e cubra com o corante fucsina de gram, aguardando cerca de 30 segundos. Por fim, lave novamente a lâmina em água destilada e seque-a, sem esfregar. Como resultado, as bactérias Gram-positivas apresentarão a cor roxa, enquanto as bactérias Gram-negativas apresentarão a cor rosa avermelhada.



Pesquise mais

Quer conhecer mais sobre a coloração de Gram? O material indicado a seguir explica a técnica e mostra um passo a passo ilustrado:

LABORATÓRIO DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS. **Mini-curso coloração de Gram.** IX Semana de Biologia, UFPB. Disponível em: <<http://www.dbm.ufpb.br/microbio/Download/Colora%E7%E3o%20de%20Gram.pdf>>. Acesso em: 4 jul. 2018.

Para determinados tipos de pesquisa será necessário ainda o isolamento do microrganismo em uma cultura pura, sem qualquer interferência de possíveis contaminantes, que muitas vezes não é possível pela técnica de semeadura via diluições. O isolamento poderá ser realizado de acordo com diferentes técnicas que dependerão do substrato em que o microrganismo se encontra (tecido vegetal, solo ou inseto, por exemplo) e do seu estágio de desenvolvimento (para os fungos, por exemplo, analisar se ele se encontra em fase de micélio ou esporulação).

De acordo com Carollo e Filho (2016) o isolamento poderá ocorrer de maneira direta ou indireta, sendo que o direto, se baseia na transferência direta dos microrganismos, com o auxílio de uma alça ou agulha de níquel-cromo, diretamente para o meio de cultura. Essa técnica geralmente é utilizada para isolamento de fungos entomopatogênicos de insetos ou ainda de fungos fitopatogênicos de tecido vegetal, desde que tenham suas estruturas reprodutivas (esporos) visíveis a olho nu. Já o indireto se baseia na transferência de parte do substrato contaminado para um meio de cultura. Esse substrato poderá ser tecido vegetal hospedeiro, amostras de solo e

sementes infestadas em que não seja possível visualizar estruturas do microrganismo a olho nu.

Assim, para o isolamento direto, é importante com o auxílio de uma lupa, identificar as estruturas do patógeno que se pretende isolar. Em capela de fluxo laminar, realize a flambagem de uma agulha de níquel-cromo ou platina, espere esfriar, toque no microrganismo levemente e em seguida, toque na placa de Petri contendo meio de cultura. Ao finalizar o procedimento, incubar em incubadora do tipo B.O.D. até o aparecimento da colônia esperada.

Já o isolamento indireto é um pouco mais complexo, pois necessita de maior cuidado na manipulação e limpeza da amostra antes da semeadura. Para isso, separe uma pequena porção da amostra na qual se pretende isolar o microrganismo. Segundo Carollo e Filho (2016), para os casos de patógenos de plantas, é importante retirar fragmentos da região limítrofe entre a lesão da planta e a área sadia, uma vez que é nesse local em que está a maior probabilidade de se encontrar o patógeno em maior atividade. Áreas de necrose, no centro das lesões, normalmente contêm alta concentração de microrganismo saprófitas que poderão contaminar sua colônia a ser isolada (CAROLLO; FILHO, 2016).

Com ajuda de uma pinça, coloque os fragmentos em um béquer contendo álcool 70% por 2 minutos e, posteriormente, em um béquer contendo hipoclorito de sódio a 0,5% por 2 minutos. Em seguida, realize a lavagem dos fragmentos utilizando água destilada estéril e transfira para um papel de filtro. Em capela de fluxo laminar, com o auxílio de uma pinça flambada, coloque pelo menos três fragmentos sobre o meio de cultura em placa de Petri. Ao finalizar o procedimento, incubar em incubadora do tipo B.O.D. até o aparecimento da colônia esperada. Após a formação das colônias é necessária a repicagem para outra placa contendo meio de cultura até à formação de uma cultura pura.

Assim, chegamos ao final de mais uma seção e também ao final do conteúdo da disciplina de Microbiologia Agrícola. É importante que você tenha consciência de que o conhecimento passado a você até aqui foi apenas uma pílula em relação ao volume de informações que a área microbiológica possui e a infinidade de

possíveis aplicações na agricultura. Entretanto, agora você com certeza estará mais preparado para novos desafios, uma vez que já possui todo o embasamento teórico necessário para se aprofundar nos seus estudos e descobertas. Continue sempre estudando!

Sem medo de errar

Agora sim, chegamos à resolução do seu último desafio nessa disciplina. Nessa seção você conheceu algumas das principais técnicas laboratoriais para análises microbiológicas, semeadura e isolamento de microrganismos e está pronto para auxiliar o técnico de laboratório que trabalha com você, em sua rotina de trabalho.

Lembre-se que, acompanhando o processo de análise microbiológica de uma amostra de solo no laboratório em que trabalha, você decide analisar detalhadamente todas as etapas realizadas pelo técnico e percebe que ele, por ser pouco experiente, vem passando por algumas falhas na execução correta dos procedimentos. Algumas dúvidas dele são: "Por que é necessário realizar diluições seriadas para a realização de procedimentos como a semeadura e isolamento? É realmente necessário flambar os instrumentos de semeadura e repicagem a cada movimento? E por que não podemos confiar apenas na análise macroscópica da colônia para identificação de um determinado microrganismo?"

Você deve começar explicando ao técnico que, de acordo com o tipo de amostra e do objetivo da atividade, será necessária a realização de diluições sucessivas para a semeadura. Isso porque ao se trabalhar com amostras puras ou muito concentradas, a quantidade de microrganismos no meio de cultura será grande, e certamente você não conseguirá quantificá-los, separá-los ou identificá-los. Se considerarmos que cada propágulo (células, esporos ou hifas) originará uma colônia sobre o meio de cultivo, quando a concentração de microrganismos semeados/inoculados for muito grande, o crescimento de colônias ocorrerá de maneira sobreposta, impossibilitando sua análise, isolamento ou contagem.

Outro ponto importante de se reforçar é que os procedimentos de semeadura e repicagem devem ser realizados de maneira que a cada movimento realizado, a alça ou agulha seja flambada utilizando

o bico de Bunsen a fim de evitar quaisquer riscos de contaminação. Oriente-o que a alça seja flambada na posição vertical e fique atrás da chama para que não exista nenhum risco de acidente com o operador. Ainda sobre flambagem, é importante orientar que em procedimentos de sementeira e repicagem em tubos de ensaio, deve-se retirar a rolha e flambar a boca do tubo, sempre mantendo a rolha segura com o dedo mínimo até o final da sementeira. Neste ponto a rolha não deve repousar sob a bancada da capela, assim como os instrumentos, que devem ser repousados em Becker de vidro contendo álcool 70% antes da flambagem.

Por fim, explique ao técnico que além da análise macroscópica da colônia, uma análise microscópica também se faz necessária, a fim de identificar ou descrever o microrganismo. Para alguns fungos filamentosos, muitas vezes é possível identificar, micro e macroscopicamente, até nível de gênero, entretanto é muito importante citar que, por mais que alguns microrganismos mais conhecidos por você possam ser identificados por características morfológicas, apenas uma investigação a nível molecular poderá confirmar qual é a espécie que está sendo analisada e isolada.

Agora, após responder aos questionamentos do técnico você deverá redigir os procedimentos realizados, juntamente com as instruções relacionadas às amostragens e às normas de segurança do laboratório já elencadas nas etapas anteriores. Bom trabalho!

Avançando na prática

Recebendo amostra de folhas para identificação de fitopatógenos

Descrição da situação-problema

Você trabalha em um laboratório de microbiologia e acabou de receber amostras de folhas para isolamento do possível fitopatógeno que está acometendo a cultura relacionada.

Analisando as folhas a olho nu, você observou manchas que variam de 1 a 3 mm de diâmetro, com coloração amareladas e

alaranjadas. Ao observar o material em lupa, você pôde verificar que as machas possuíam aspecto pulverulento e logo reconheceu se tratar de uma infecção por fungos, uma vez que foi possível a observação de seus esporos. Sendo assim, você logo decide realizar o processo de isolamento direto dos esporos que estão visíveis, e parte para a organização dos materiais para começar o procedimento. Um colega de trabalho, observando você trabalhar lhe questiona: “Por que você não irá utilizar o processo de isolamento indireto? Colocando a folha com o microrganismo em placa de Petri para obtenção da cultura do microrganismo? E agora, o que você responderá a ele? Será ele está correto e você deveria utilizar o procedimento de isolamento indireto?”

Resolução da situação-problema

Você deve explicar ao seu colega de trabalho que o procedimento escolhido por você está correto e é o mais adequado para a amostra recebida. Explique a ele que um isolamento poderá ser realizado de maneira direta ou indireta, de acordo com o substrato em que o microrganismo se encontra (tecido vegetal, solo ou inseto, por exemplo) e do seu estágio de desenvolvimento (para os fungos, por exemplo, analisar se ele se encontra em fase de micélio ou esporulação).

O isolamento direto, escolhido por você, se baseia na transferência direta dos microrganismos, com o auxílio de uma alça ou agulha de níquel-cromo, diretamente para o meio de cultura. Essa técnica geralmente é utilizada para isolamento de fungos entomopatogênicos, de insetos ou ainda de fungos fitopatogênicos de tecido vegetal, desde que tenham suas estruturas reprodutivas (esporos) visíveis a olho nu. Já o indireto se baseia na transferência de parte do substrato contaminado para um meio de cultura. Esse substrato poderá ser tecido vegetal hospedeiro, amostras de solo e sementes infestadas em que não seja possível visualizar estruturas do microrganismo a olho nu.

Faça valer a pena

1. No dia a dia de um laboratório de microbiologia, quando uma placa de Petri possuir diferentes colônias é importante anotar quantos tipos

de colônias se desenvolveram e as características morfológicas de cada uma. As colônias podem ser classificadas e descritas basicamente por meio de critérios como forma, elevação e margem. Analise os aspectos morfológicos da colônia a seguir:

Figura 4.11 | Morfologia de colônia



Fonte: adaptado de <<https://www.biomedicinapadrao.com.br/2013/08/descricao-morfologica-de-colonias-em.html>>. Acesso em: 4 jul. 2018.

Após a análise macroscópica da colônia esquematizada na figura, assinale a alternativa que corresponde à correta classificação de acordo com sua forma, elevação e margem, respectivamente:

- a) Puntiforme; plana; inteira.
- b) Circular; elevada; ondulada.
- c) Filamentosa; elevada; lobulada.
- d) Circular; convexa; filamentosa.
- e) Irregular; elevada; espiral.

2. Em relação às técnicas de semeadura em tubos, analise a afirmação a seguir:

Chamamos de _____ ou _____, a técnica onde a distribuição da amostra é realizada espalhando-se com alça de níquel-cromo ou platina (ponta em forma de alça) sobre o meio de cultura inclinado no tubo. Geralmente, essa distribuição é feita da base do meio de cultura para a extremidade do mesmo.

Assinale a alternativa que completa corretamente as lacunas do trecho, na ordem em que aparecem:

- a) Esgotamento da alça; picada.
- b) Picada; estriamento.
- c) Semeadura; repicagem.
- d) Repicagem; estriamento.
- e) Esgotamento da alça; estriamento.

3. Analise as asserções a seguir e a relação proposta entre elas:

I. Se considerarmos que cada propágulo (células, esporos ou hifas) originará uma colônia sobre o meio de cultivo, quando a concentração de microrganismos semeados/inoculados for muito grande, impossibilitará sua análise, isolamento ou contagem.

PORQUE

II. Ao se trabalhar com amostras puras ou muito concentradas o crescimento de colônias ocorrerá de maneira sobreposta.

Assinale a alternativa que apresenta a correta relação entre as asserções:

- a) A asserção I é correta e a II é falsa.
- b) A asserções I e II são corretas e a II não justifica a I.
- c) A asserções I e II são corretas e a II justifica a I.
- d) A asserção I é falsa e a II é correta.
- e) As asserções I e II são falsas.

Referências

ALMEIDA, J. E. M.; BATISTA-FILHO, A.; LEITE, L. G. **Curso controle microbiano de insetos: fungos entomopatogênicos**. Instituto Biológico, Laboratório de Controle Biológico. Campinas: 2014.

CÂMARA, B. **Descrição morfológica de colônias em microbiologia**. Biomedicina Padrão, 2013. Disponível em: <<https://www.biomedicinapadiao.com.br/2013/08/descricao-morfologica-de-colonias-em.html>>. Acesso em: 4 jul. 2018.

CAROLLO, E. M.; FILHO, H. P. S. **Manual básico de técnicas fitopatológicas: laboratório de fitopatologia**. Embrapa mandioca e fruticultura. Brasília: 2016. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1054670/manual-basico-de-tecnicas-fitopatologicas-laboratorio-de-fitopatologia-embrapa-mandioca-e-fruticultura>>. Acesso em: 8 jul. 2018.

Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ/USP. Departamento de Ciência do Solo. **Instruções para coleta e remessa de amostras**. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/departamentos/lso/coleta.htm>>. Acesso em: 24 jun. 2018.

Fundação Ezequiel Dias - FUNED. **Manual de coleta de amostras**. Belo Horizonte, 2018. Disponível em: <<http://www.funed.mg.gov.br/wp-content/uploads/2011/07/DIOM-DIVISA-SGA-MQ-0001-MANUAL-DE-COLETA-DE-AMOSTRAS.pdf>>. Acesso em: 22 jun. 2018.

HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. EMBRAPA, Brasília: 1994. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/199952/manual-de-metodos-empregados-em-estudos-de-microbiologia-agricola>>. Acesso em: 12 jun. 2018.

Instituto Agronômico de Campinas – IAC. Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Solos e Recursos Ambientais. **Como retirar amostra de solo**. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/produtoseservicos/analisedosolo/retiraramostrasolo.php>>. Acesso em: 24 jun. 2018.

IPSEMG. **Procedimento Operacional Padrão: Realizar cultura para fungos**. Disponível em: <http://www.ipsemg.mg.gov.br/ipsemg/ecp/files.do?evento=download&urlArqPlc=pop_lab_mic_-_025_2019.pdf>. Acesso em: 11 jun. 2018

LABORATÓRIO DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS. **Mini-curso Coloração de Gram**. IX Semana de Biologia, UFPB. Disponível em: <<http://www.dbm.ufpb.br/microbio/Download/Colora%E7%3o%20de%20Gram.pdf>>. Acesso em 04 jul. 2018.

LEITE, M.A. **Armazenamento e beneficiamento de grãos: Amostragem dos grãos**. Disponível em: <https://wp.ufpel.edu.br/nutricaoanimal/files/2011/04/Amostragem_gr%C3%A3os.pdf>. Acesso em: 24 jun. 2018.

Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA. **Manual de procedimentos para laboratórios**. 3. ed. Brasília: 2018. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov>>.

br/assuntos/laboratorios/legislacoes-e-metodos/poa/Manualdeprocedimentosparalaboratrios2018publicadoemfev_2018.pdf>. Acesso em: 22 jun. 2018.

RESENDE, F. M. **Manual de segurança do laboratório de microbiologia**. UFPB. João Pessoa: 2014. <<http://www.ctdr.ufpb.br/ctdr/contents/documentos/pdf/manual-de-seguranca-do-laboratorio-de-microbiologia-v-01-2014>>. Acesso em 12 jun. 2018.

SAKATA, R. A. P.; SABBAG, S. P.; MAIA, J. T. L. S. Disponível em: <<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2011b/ciencias%20da%20saude/ocorrencia.pdf>>. Acesso em: 25 jun. 2018.

ISBN 978-85-522-1153-2



9 788552 211532 >