

**CONTAGEM MICROBIANA, ATIVIDADE DE β -GLICOSIDASE E
ISOLAMENTO DE FUNGOS TERMOFÍLICOS/TERMOTOLERANTES EM
SOLOS COM CULTIVO CONVENCIONAL E AGROECOLÓGICO**

MICROBIAL COUNT, β -GLUCOSIDASE ACTIVITY AND ISOLATION OF
THERMOPHILIC/THERMOTOLERANT FUNGI IN SOILS WITH CONVENTIONAL AND
AGROECOLOGICAL CULTIVATION

Eduardo da Silva Martins

Universidade do Estado de Minas Gerais
eduardo.martins@uemg.br

Gabriel de Morais Gianfredo

Universidade do Estado de Minas Gerais
gabrielgianfredo871@gmail.com

Heytor Lemos Martins

Universidade Estadual Paulista
heytor.martins@uemg.br

Pedro Luís da Costa Aguiar Alves

Universidade Estadual Paulista
pl.alves@unesp.br

Resumo

A busca por alimentos mais saudáveis e com produção sustentável fez com que nos últimos anos houvesse uma grande expansão dos sistemas agroecológicos de produção, contrapondo-se ao uso de defensivos agrícolas, característico dos sistemas convencionais. Este trabalho teve como objetivo avaliar se os sistemas de manejo e tipos de cultura afetam a quantidade de fungos e bactérias, bem como a atividade de β -glicosidase e a presença de fungos termofílicos/termotolerantes produtores dessa enzima, no solo. Foram feitas oito coletas em uma área com sistemas convencional e agroecológico/orgânico de produção, no município de Fronteira/MG, em três pontos (horta agroecológica; cultivo convencional de abacaxi e cultivo convencional de cana-de-açúcar). Como indicadores da qualidade do solo, foram avaliadas a população de bactérias e fungos, bem como a atividade da enzima β -glicosidase. Além disso, foram isoladas linhagens de fungos termotolerantes/termofílicos do solo e analisado o potencial de produção de β -glicosidase pelos fungos. Verificou-se que os solos provenientes da horta agroecológica e com cultivo convencional de cana-de-açúcar propiciaram quantidades significativamente maiores de fungos e bactérias e também atividades mais elevadas da enzima β -glicosidase, em relação ao solo com cultivo convencional de abacaxi. O solo que propiciou a maior quantidade de fungos com potencial de produção da enzima foi o com cultivo agroecológico de hortaliças, seguido dos solos com cultivo de cana-de-açúcar e abacaxi. Assim, conclui-se que tanto a microbiota quanto a atividade de β -glicosidase foram bons indicadores de qualidade do solo na área estudada.

Palavras-chave: Qualidade do solo; Microorganismos; Enzima.

Abstract

The search for healthier foods with sustainable production has led to a great expansion of agroecological production systems in recent years, opposing the use of pesticides, characteristic of conventional systems. The objective of this work was to evaluate whether the management system and type of culture affects the number of fungi and bacteria, as well as β -glucosidase activity and the presence of thermophilic/thermotolerant fungi that produce this enzyme in the soil. Eight gathers were made in an area with conventional and agroecological/organic production systems, in the municipality of Fronteira/MG, at three points (agroecological garden; conventional pineapple cultivation and conventional sugarcane cultivation). As indicators of soil quality, were evaluated the population of bacteria and fungi, as well the activity of the β -glucosidase enzyme. In addition, thermotolerant/thermophilic fungi's lineages from the soil were isolated and analysed the potential for β -glucosidase production by the fungi. It was verified that the soils from the agroecological garden and the conventional sugarcane cultivation provided significantly greater amounts of fungi and bacteria and also higher activities of the β -glucosidase enzyme than the soil with conventional pineapple cultivation. The soil with agroecological cultivation of vegetables provided the highest number of fungi with enzyme production potential, followed by soils with sugarcane and pineapple cultivation. Thus, it was concluded that both the microbiota and the β -glucosidase activity were good indicators of soil quality in the studied area.

Keywords: Soil quality; Microorganisms; Enzyme.

1. Introdução

O sistema convencional de agricultura é considerado altamente dependente de insumos externos, como fertilizantes químicos e agrotóxicos que, se utilizados de maneira inadequada, podem provocar contaminação de solos, água e ar, além de causar resistência de pragas e aumento das emissões de gases de efeito estufa (TSCHARNTKE et al., 2012). Em contraponto, os sistemas agroecológicos representam um meio de mitigar os efeitos negativos da intensificação agrícola convencional. Nos sistemas agroecológicos, não são utilizados agroquímicos ou fertilizantes inorgânicos. Além disso, a manutenção da cobertura permanente do solo, integração da adubação orgânica e verde, controle da erosão, manejo da fertilidade do solo, além do controle biológico de pragas, são outras práticas amplamente utilizadas nestes sistemas (WINQVIST et al., 2012; ROSSET et al., 2014).

O manejo do solo exerce grande influência sobre a população microbiana, quantitativa e qualitativamente (SILVA et al., 2011). Solos produtivos apresentam grande diversidade de espécies de microrganismos que são responsáveis pela decomposição da matéria orgânica, mineralização e transferência de nutrientes entre os diferentes compartimentos do solo, controle biológico de patógenos, produção de substâncias promotoras de crescimento, fixação biológica de nitrogênio atmosférico e degradação de substâncias tóxicas no solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A atividade microbiana é um dos grandes mediadores da formação do solo e estabilização de seus agregados, de tal forma que a presença de micro-organismos faz parte da definição de “solo” (BALD et al., 2021). A maioria dos organismos do solo utiliza a matéria orgânica como fonte de energia e nutrientes para a realização dos processos de transformação do Carbono, incluindo a mineralização, imobilização e a formação de substâncias húmicas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A microbiota do solo também contribui com a liberação gradativa e contínua de nutrientes da matéria orgânica para as plantas e após a morte dos microrganismos, parte do conteúdo celular também se torna disponível às plantas. O tipo de cobertura vegetal e o manejo do solo promovem, ainda, alterações em suas propriedades físicas e químicas, afetando também a atividade microbiana e conseqüentemente o potencial de uso do solo para cultivo (RAMOS et al., 2012). Neste contexto, índices de biomassa microbiana têm sido utilizados como indicadores da qualidade do solo, uma vez que tais atributos são sensíveis ao tipo de manejo e às alterações causadas no solo (CARDOSO; ANDREOTE, 2016).

Embora plantas e animais também sejam fontes de enzimas do solo, os microrganismos são sua fonte primária. Essas enzimas apresentam papel fundamental na decomposição da matéria orgânica do solo e na ciclagem de nutrientes. Por conta dessa relação com vários aspectos do funcionamento do solo, as atividades das enzimas do solo são também consideradas excelentes indicadores de qualidade do solo (MOGHIMIAN et al., 2017). Outra vantagem do uso de enzimas do solo como indicadores de qualidade inclui sua sensibilidade e resposta a mudanças no manejo agrícola (MENDES et al., 2021; RODRIGUES et al., 2022).

Pela ação na liberação de glicose, as β -glicosidases ou β -D-glucoside gluco-hidrolases (EC 3.2.1.21) são consideradas enzimas muito importantes como indicadoras de decomposição da matéria orgânica no solo, atuando na ciclagem do Carbono (FERREIRA; STONE; MARTIN-DIDONET, 2017). Por isso, a mensuração da atividade dessa enzima tem sido crescentemente recomendada como um bom indicador de qualidade dos solos, principalmente pela alta sensibilidade dessas enzimas a mudanças provocadas pelo seu uso e manejo (PAZUTTI et al., 2012).

Juntamente com outros microrganismos, os fungos desempenham importante papel na formação do solo, ciclagem de nutrientes e evolução da fertilidade, nutrição de plantas, e degradação e depuração de substâncias tóxicas. Além da importância ambiental, fungos e seus

produtos apresentam grande potencial biotecnológico, tais como inoculantes, agentes de controle biológico, fármacos, biossurfactantes, aminoácidos, enzimas, dentre outros (AHIRVAR et al., 2017; LEE et al., 2018). Nos últimos anos, fungos termofílicos e termotolerantes têm sido de grande interesse científico, principalmente em relação ao seu potencial biotecnológico com a produção de enzimas termoestáveis, as quais têm sido estudadas com vistas à sua aplicação em bioprocessos. Muitas pesquisas têm focado a identificação de linhagens microbianas termofílicas ou termotolerantes, capazes de produzir enzimas mais estáveis em relação à temperatura, a variações de pH e a enzimas proteolíticas (RIGOLDI et al., 2018; CERDA et al., 2019; MARTINS; MARTINS; MARTINS, 2020).

Diante deste contexto, este trabalho teve como objetivos avaliar se o tipo de cultivo (sistemas convencionais de produção de abacaxi e cana-de-açúcar; e horta agroecológica) afeta a microbiota e a atividade de β -glicosidase no solo, bem como a presença de fungos termofílicos/termotolerantes potencialmente capazes de produzir a enzima de β -glicosidase.

2. Material e Métodos

Área experimental e coleta de solos

As coletas foram realizadas na Fazenda Horta Rio Grande e em uma propriedade vizinha (Figura 1). A Horta está localizada no município de Fronteira na região Sudeste do país, na mesorregião do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba e Microrregião de Frutal. Possui latitude 20°08'52" sul, longitude 49°05'11" oeste. Localiza-se as margens do Rio Grande.



Figura 1. Área e pontos de coleta. Fonte: Próprio autor, 2023.

A propriedade tem certificação de produção orgânica emitido pelo IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária) e pela ECOFAM (Associação de Agroecologia Familiar) e os agricultores proprietários fazem parte da CSA (Comunidade que Sustenta a Agricultura).

As amostras de solo foram coletadas entre 08h e 10h em três pontos distintos sendo: uma horta agroecológica (P1); uma área com cultivo convencional de abacaxi (P2); e uma área com cultivo convencional de cana-de-açúcar (P3). O cultivo de abacaxi é feito dentro da propriedade (a cerca de 200m da horta agroecológica), já o plantio de cana faz parte de uma propriedade vizinha (a cerca de 500m da horta agroecológica).

As coletas das amostras ocorreram mensalmente, entre Fevereiro e Setembro de 2022, totalizando 8 coletas. Em cada coleta, foram retirados cerca de 100g de solo de cada área selecionada, na profundidade de até 20 cm, com auxílio de um trado. Em cada área, foram coletadas 10 sub-amostras, as quais foram juntadas em uma amostra composta. Estes solos foram armazenados em sacos plásticos, identificados e transportados para o Laboratório de Microbiologia da Universidade do Estado de Minas Gerais – UEMG, Unidade Frutal.

Contagem de bactérias e fungos mesófilos totais do solo

Para contagem dos microrganismos foram utilizados os meios de cultura Sabouraud (Acumedia) para crescimento de bolores e leveduras e Plate Count Agar (Acumedia) para crescimento de bactérias. Os meios foram aquecidos e posteriormente autoclavados a 121 °C, por 15 minutos.

Para o preparo do solo, cada amostra foi seca a temperatura ambiente e peneirada, para retirada de restos de vegetais. Posteriormente, pesou-se 10 gramas de cada amostra de solo e diluiu-se em 90 mL de água peptonada 0,1% esterilizada, sendo esta a diluição 10^{-1} . Posteriormente, levou-se essas amostras para mesa agitadora (Astral Científica CT-155) mantendo-as por 20 minutos com rotação de 55 RPM. Em seguida dilui-se 1 mL da solução em 9 mL de água peptonada 0,1%, e assim sucessivamente até a diluição 10^{-6} (BORDIGON et. al, 2012).

Após o preparo das amostras de solos, foi feito o plaqueamento por semeadura em profundidade, em duplicata. As placas foram então incubadas a 35 °C durante 2 dias (para bactérias) e a 28 °C durante 5 dias (para fungos). Após esse período, foram feitas as contagens com os resultados sendo expressos em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama de solo.

Determinação da atividade de β -glicosidase no solo

Para determinar a atividade de β -glicosidase nas amostras de solo, o solo foi peneirado usando peneira de 4 mm, retirando-se com pinça todos os pedaços de raízes, tecidos de plantas e outros materiais orgânicos grosseiros que possam interferir na determinação da análise. Posteriormente, pesou-se 1g de cada amostra de solo, as quais foram colocadas em um tubo de ensaio. Nestes, foram adicionados 4mL de tampão universal modificado (MUB) pH 6,0 e 1mL de p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (PNG) (Sigma-Aldrich) a todos os frascos (menos os controles). Este material foi incubado por uma hora a 37 °C com rolhas de borracha (para evitar evaporação). Após esse período, foram adicionados 1mL de CaCl_2 0,5M, 4mL de THAM pH 12,0 e 1mL de PNG (este último só nos controles). As amostras foram então filtradas por meio de papel de filtro Whatman nº 2 e com a solução obtida foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 420 nm.

A concentração de p-nitrofenol produzido foi avaliada a partir de uma curva padrão com concentrações conhecidas de p-nitrofenol (0; 10; 20; 30; 40 e 50 μg p-nitrofenol mL^{-1}) com $R^2 > 0,99$, na regressão linear e depois determinada a absorbância em espectrofotômetro a 420nm.

Isolamento de fungos filamentosos termofílicos/termotolerantes do solo, com potencial de produção de β -glicosidase

Para o isolamento de fungos filamentosos termofílicos/termotolerantes do solo, 0,5g de solo foram adicionados em frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 20mL de meio nutriente composto por (g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,4); KH_2PO_4 (2,0); CaCl_2 (0,3); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2); peptona (5,0); extrato de levedura (2,0); ureia (0,3); Tween 80 (1,0); solução de sais a 0,1%, sendo a solução de sais composta por (mg/mL): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5,0); $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1,6); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,4); CoCl_2 (2,0).

Os frascos foram mantidos em estufa a 45 °C, por 24-48 horas. Após este período, 0,1 mL deste pré-cultivo foi assepticamente transferido para o centro de uma placa de Petri contendo o meio nutriente composto por farinha de aveia (3%) e agar (2%). O material foi espalhado com o auxílio de alça de Drigalski e a placa foi incubada a 45°C, até o aparecimento das colônias.

As colônias de fungos filamentosos isoladas foram diferenciadas com base no aspecto do anverso e reverso do micélio e cor dos esporos (quando presentes), e reinoculadas através de estrias de esgotamento, em meio de isolamento, até a obtenção de culturas puras.

Cultivo dos fungos para produção de β -glicosidase

Os fungos isolados foram cultivados em uma mistura de três substratos: bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de malte e farelo de trigo (1:1:1 p/p). O bagaço de cana *in natura* e o bagaço de cevada foram adquiridos, respectivamente, de uma usina e de uma cervejaria do município. O farelo de trigo (Quaker) foi adquirido no mercado local. O bagaço de cana-de-açúcar foi triturado e peneirado, sendo utilizadas partículas de 1 a 3 mm. Todos os substratos foram lavados e secos a 65°C.

Para obtenção da suspensão fúngica a ser inoculada no substrato, os fungos foram inicialmente inoculados na superfície do meio nutriente de aveia, em frascos Erlenmeyer de 250 mL e incubados a 45 °C até completo crescimento. Após este período, o microrganismo foi suspenso, com auxílio de alça de inoculação, em uma solução composta por (g/L): (NH)₂SO₄ (3,5); KH₂PO₄ (3,0); MgSO₄.7H₂O (0,5); CaCl₂ (0,5), Tween 80 (10,0), com pH ajustado para 5,0, obtendo-se assim uma suspensão micelial a ser inoculada no substrato.

O cultivo em estado sólido ocorreu em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 10g do substrato, sendo inoculado em cada Erlenmeyer 15 mL de suspensão micelial. Os fungos foram cultivados a 45 °C e, a cada 48h, amostras foram retiradas, até 240 horas (10 dias). A cada amostra retirada, foram adicionados 40mL de água destilada, sendo a mistura homogeneizada manualmente e mantida sob agitação em shaker (100 rpm), por 20 minutos. Após este período, o material foi filtrado em disco de tecido nylon, centrifugado a 10000 xg por 15 min, a 5 °C, e o sobrenadante (extrato enzimático bruto) foi utilizado para determinação da atividade da enzima.

Determinação das atividades enzimáticas pelos fungos isolados

Para a determinação da atividade de β -glicosidase pelos fungos isolados, 50 μ L do extrato enzimático foram adicionados à mistura de 250 μ L de solução tampão acetato (0,1 M, pH 5,0) e 250 μ L de 4-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (4 mM) – PNPG, Sigma. A reação foi mantida a 55°C, por 10 minutos, e então interrompida com a adição de 2,0 mL de solução de Na₂CO₃ (2M). O nitrofenol liberado foi quantificado por espectrofotometria a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μ mol de nitrofenol por minuto de reação utilizando reta padrão obtida com solução de nitrofenol (SANTOS et al., 2016).

Análise estatística dos dados

Os experimentos de contagem de bactérias e fungos do solo foram feitos com três repetições. Com os dados, foi feita análise de variância e aplicação do teste de Tukey, ao nível de

5% de probabilidade, para as médias dos valores obtidos. Para o experimento com as atividades de β -glicosidase pelos fungos isolados, foi apresentado por meio de gráficos que expressam as médias e os respectivos erros, pois visa obter dados iniciais de potencial de produção, para seleção dos fungos com maior potencial e estudos posteriores de otimização da produção da enzima.

Uma análise de componentes principais (ACP) foi realizada com o intuito de verificar a relação entre as variáveis e os pontos de coleta. Para essa finalidade foi feita a média das variáveis para cada um dos pontos amostrais. Também por meio de uma ACP, foram comparados os cultivos dentro dos meses de coleta, buscando-se identificar a ação do período sobre a microbiota e a atividade enzimática. Todos os testes foram executados no software Statistica 13.3 (STATSOFT, 2021).

3. Resultados e Discussão

Com relação à contagem de bactérias no solo, pode-se observar que os pontos de coletas com maiores quantidades de bactérias (expressas por $\log_{10}\text{UFC.g}^{-1}.10^4$) foram na área com cultivo de cana-de-açúcar e na horta agroecológica (Figura 2a). Os valores encontrados nesses dois pontos foram significativamente superiores, pelo teste de Tukey, aos valores encontrados na área com cultivo de abacaxi. A análise estatística também mostrou que as médias nas coletas 1 e 5 foram superiores aos valores das outras coletas (Tabela 1).

Com relação à população de fungos, também pode-se observar que, com exceção da coleta 4, a quantidade de fungos foi menor no ponto de coleta com cultivo de abacaxi, quando comparada com os outros (Figura 2b). Para a contagem de fungos, a análise estatística mostrou que houve diferença significativa entre os três pontos, sendo que as maiores médias foram obtidas, respectivamente, nos solos com cultivo de cana-de-açúcar, horta agroecológica e com cultivo de abacaxi. A análise estatística também mostrou que no caso dos fungos, a maior média foi obtida na primeira coleta, seguida da segunda e das coletas 3, 5, 4, 6, 7 e 8) (Tabela 1).

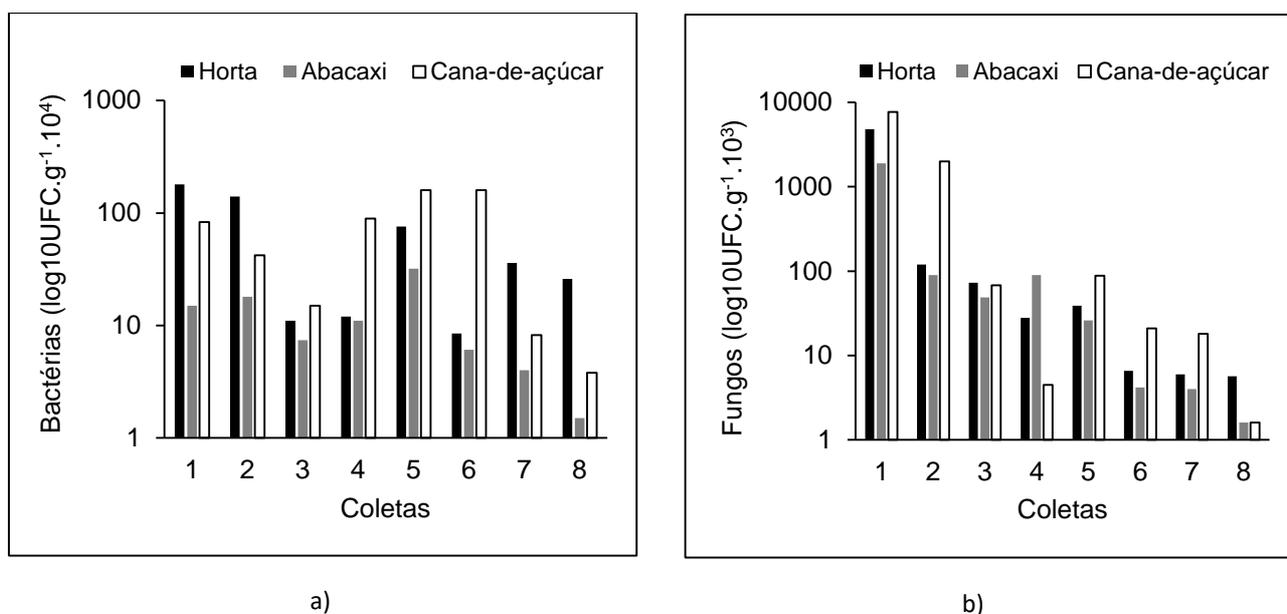


Figura 2. Contagem de bactérias e fungos nas amostras de solo. a) bactérias; b) fungos. Fonte: Organizado pelos autores.

Tabela 1. Teste de Tukey da média das contagens de bactérias e fungos nas amostras de solo.*

| Pontos | Contagem média de bactérias (UFC.10 ⁴ .g ⁻¹ solo) | Contagem média de fungos (UFC.10 ⁴ .g ⁻¹ solo) |
|--------------------------|---|--|
| Horta agroecológica (P1) | 580,12 a | 76,99 b |
| Abacaxi (P2) | 136,87 b | 37,17 c |
| Cana-de-acúcar (P3) | 525,75 a | 123,76 a |
| Coletas | | |
| 1 | 926,66 a | 480,00 a |
| 2 | 666,66 b | 136,66 b |
| 3 | 112,16 d | 6,33 c |
| 4 | 373,83 c | 4,09 c |
| 5 | 901,66 a | 5,10 c |
| 6 | 101,66 d | 1,07 c |
| 7 | 160,66 d | 0,93 c |
| 8 | 70,66 d | 0,29 c |

* Letras diferentes na coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias dos tratamentos. Fonte: Organizado pelos autores.

Em trabalho anterior feito nestas mesmas áreas, Pinheiro et al. (2020) verificaram, em coletas realizadas de Setembro a Dezembro de 2018, que amostras de solo provenientes da horta agroecológica e do cultivo de cana-de-açúcar propiciaram maiores contagens de bactérias e fungos, quando comparadas com amostras provenientes de solo sem nenhum cultivo (área de pastagem degradada) e com cultivo de abacaxi. Estes resultados foram similares ao encontrado no presente trabalho, sugerindo que há um padrão nestes pontos, em relação ao tipo de manejo do solo.

Sistemas agroecológicos apresentam solos ricos em matéria orgânica, o que contribui para uma maior quantidade e diversidade de microrganismos. Com relação aos sistemas de cultivo convencionais analisados, a manutenção da palhada na área com cana-de-açúcar possivelmente seja um grande diferencial em relação à área com cultivo de abacaxi.

Quanto aos resultados em relação aos meses de coleta, verificou-se que a contagem de fungos sofreu maior impacto em relação à época do ano, quando comparada com a contagem de bactérias. Estes resultados sugerem que a população de bactérias foi mais resistente a alterações do clima, uma vez que na região, o período de Abril a Setembro é mais seco e mais frio, em relação aos meses de Fevereiro e Março.

Estes resultados reforçam os dados observados por vários autores, quanto à microbiota do solo em relação ao manejo, sistemas de cultivo, época do ano e tipos de culturas (FERREIRA; DIDONET, 2011; FERREIRA et al., 2017; MALHEIROS et al., 2017; MENDES, SOUZA, REIS JUNIOR, 2015; RAMOS et al. 2020; SANTOS et al., 2020; BALD et al., 2021; SILVA et al., 2021).

Alguns trabalhos vêm sendo relatados comparando a microbiota do solo em sistema de cultivo convencional e agroecológico. Maluche-Baretta et al. (2006) estudaram o solo em sistemas de produção convencional e orgânico de maçã no estado de Santa Catarina e concluíram que o sistema orgânico de produção de maçãs propicia aumento nos teores de C e N da biomassa microbiana, em relação ao sistema de produção convencional.

Rech et al. (2013) pesquisaram sobre a microbiota do solo em vinhedos agroecológico e convencional e sob vegetação nativa em Caxias do Sul/RS, e constataram que o solo sob vegetação nativa apresentou maior densidade de fungos filamentosos e menor densidade bacteriana quando comparado aos vinhedos, e que o solo do vinhedo sob manejo agroecológico apresentou maior densidade bacteriana e de fungos filamentosos quando comparado ao manejo convencional, indicando que áreas sob manejo menos intensivos favorecem a estabilidade da comunidade microbiana.

Ferreira; Stone; Martin-Didonet (2017) avaliaram os efeitos da forma de manejo (sistema de semeadura direta e sistema de plantio convencional) e da fase de condução da cultura do arroz na Estação Experimental em Agroecologia, localizada na Embrapa Arroz e Feijão, em Santo Antônio de Goiás/GO, sobre a microbiota e outros atributos do solo, e observaram diferenças entre as populações de fungos e bactérias em relação aos sistemas de manejo empregados.

Ramos et al. (2020) analisaram atributos microbiológicos numa área com diferentes usos do solo (pastagem, floresta de *Eucalyptus* spp., fruticultura orgânica e solo lavrado. Os autores verificaram que, de maneira geral, os diferentes usos do solo alteraram a biomassa microbiana.

A quantificação da microbiota do solo pode dar informações sobre a qualidade do solo. Porém, quando avaliada de forma isolada, não fornece indicações sobre os níveis de atividade das populações microbianas do solo. Dessa forma, é importante também avaliar parâmetros que

estimem a atividade microbiana, tais como a medida da atividade enzimática, para verificar o estado metabólico das comunidades de microrganismos do solo (SOUTO et al., 2009; SILVA et al., 2021).

Nos testes de avaliação da atividade da enzima β -glicosidase nas amostras de solo, foi observado que, assim como ocorreu com a contagem de fungos, houve diferença significativa entre os três pontos (Tabela 2), com as maiores médias sendo obtidas, respectivamente, na horta agroecológica, no cultivo de cana-de-açúcar e no cultivo de abacaxi (Figura 3). Com relação às coletas, houve diferença estatística entre as três primeiras e as demais (Tabela 2).

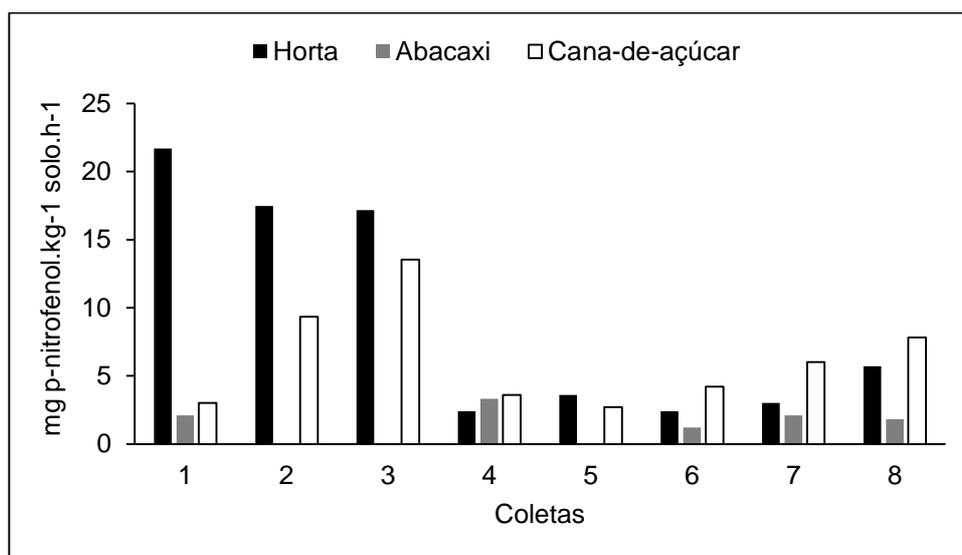


Figura 3. Atividade de β -glicosidase nas amostras de solo. Fonte: Organizado pelos autores.

Tabela 2: Teste de Tukey das médias de atividade de β -glicosidase nas amostras de solo.*

| Pontos | Atividade de β -glicosidase (mg p-nitrofenol.kg ⁻¹ solo.h ⁻¹) |
|----------------|---|
| 1 | 9,18 a |
| 3 | 6,28 b |
| 2 | 1,31 c |
| Coletas | |
| 1 | 8,93 a |
| 2 | 8,93 a |
| 3 | 10,24 a |
| 4 | 3,11 bc |
| 5 | 2,10 c |
| 6 | 2,60 bc |
| 7 | 3,71 bc |
| 8 | 5,12 b |

* Letras diferentes na coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias dos tratamentos.
Fonte: Organizado pelos autores.

Os resultados de atividade de β -glicosidase no solo indicaram que o tipo de sistema de cultivo, de cultura e a época do ano afetam também a atividade da enzima, sugerindo assim que, junto à contagem microbiana, a determinação da atividade de β -glicosidase pode ser um bom indicador de qualidade do solo. Estes resultados corroboram aqueles resultados por diversos autores (STOTT et al., 2010); FERREIRA; DIDONET, 2011; EVENAGELISTA et al., 2012; SANTOS et al., 2020; RODRIGUES et al., 2022).

A atividade enzimática está relacionada a inúmeras reações necessárias para a vida microbiana no solo, como decomposição de resíduos orgânicos, ciclagem de nutrientes, formação da matéria orgânica e estruturação do solo, constituindo-se dessa forma, em um indicador sensível para ser utilizado na avaliação da qualidade do solo (RAMOS et al., 2020; RODRIGUES et al., 2022).

Plantas e animais podem contribuir com o perfil enzimático no solo, porém os microrganismos são considerados as principais fontes de enzimas do solo. Dentre essas, destacam-se as hidrolases (α e β -glicosidases, ureases, desaminases, sulfatases, amidases, proteases, celulasas) e oxidorreduções (polifenol oxidases, peroxidases) fundamentais na manutenção do ciclo de nutrientes, disponibilização de minerais como nitrogênio, fósforo e carbono, além da hidrólise de matéria orgânica (EVANGELISTA et al., 2012).

A β -glicosidase, ao hidrolisar a celobiose, libera glicose, e assim regula o suprimento de fontes de energia para micro-organismos que não são capazes de utilizar diretamente a celobiose (BHARDWAJ et al., 2021). Os processos de decomposição de restos de plantas envolvem uma

grande variedade de enzimas que trabalham em cascata. Qualquer alteração em uma dessas enzimas gera um desequilíbrio no processo de decomposição e compromete a função de degradação e conseqüentemente, altera a qualidade do solo. Neste sentido, a avaliação da atividade de β -glicosidase tem sido utilizada como indicador complementar da qualidade de solo (RAMOS et al., 2020; RODRIGUES et al., 2022).

Santos et al. (2020) relataram que, de maneira geral, a maioria dos trabalhos científicos relatam que solos sob cultivo orgânico apresentam valores de carbono e nitrogênio da biomassa microbiana e atividade microbiana e enzimática superiores aos solos sob cultivo convencional. Isso se deve ao fato de que no cultivo orgânico ocorrem maiores adições de resíduos que funcionam como substrato e fonte de energia para os micro-organismos.

Na análise de componentes principais, o primeiro componente (PC1) da análise de componentes principais envolvendo os pontos de coleta (culturas) e variáveis microbiológicas (Figura 4a) explicou 85,45% da variabilidade original dos dados e o segundo componente principal (CP2) explicou 14,55%. O gráfico mostra que, dentre os sistemas, o sistema de Horta, que se posicionou do lado positivo da PC2 tem maior relação com o potencial de produção de β -glicosidase e de contagem de bactérias. Já os dados de contagem de fungos, que estão posicionados ao lado negativo da PC2, possuem maior assimilação com áreas de cultivo de cana-de-açúcar. Na área com cultivo de abacaxi, o único que se apresenta ao lado positivo da PC1 e PC2, se distancia dos diferentes parâmetros microbiológicos avaliados.

Na PCA que avalia as variáveis em relação aos meses, é possível verificar que o primeiro componente (PC1) envolvendo os meses de coleta (Figura 4b) e variáveis microbiológicas explicou 63,61% da variabilidade original dos dados e o segundo componente principal (CP2) explicou 28,95%. Neste gráfico é possível verificar que os meses que possuem maior relação com fungos, β -glicosidase e bactérias são os meses de fevereiro e março, os quais se encontram do lado positivo da PC1. Assim, os demais meses se encontram ao lado contrário às variáveis, mostrando menor relação com as variáveis analisadas.

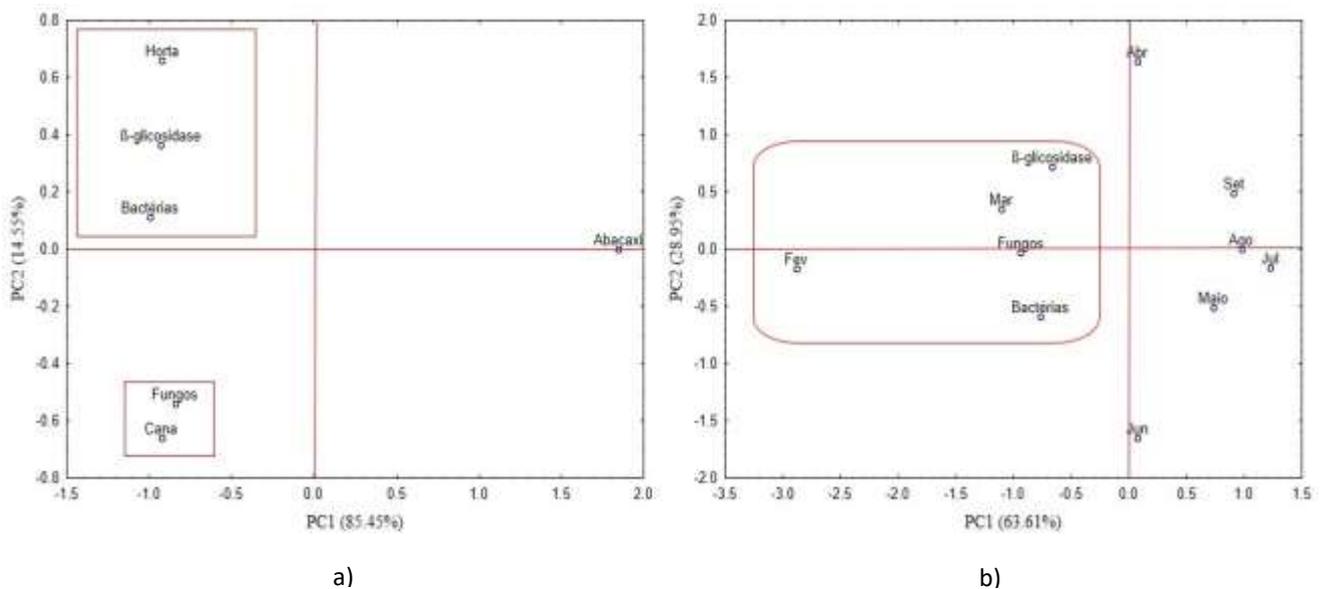


Figura 4. Gráfico biplot da análise de componentes principais envolvendo os pontos de coleta (a), meses (b) sobre a contagem microbiana e atividade de β -glicosidase. **Fonte:** Organizado pelos autores.

No isolamento de fungos filamentosos termofílicos/termotolerantes com potencial de produção de β -glicosidase, foram isoladas nove linhagens, sendo sete de amostras de solo da horta agroecológica (linhagens 1, 2, 3, 5, 6, 7 e 8) e duas da área com cana-de-açúcar (linhagens 4 a 9). A linhagem 4 foi a que apresentou os maiores valores de atividade enzimática, após 8 e 10 dias de cultivo (Figura 5). Ressalta-se que estão colocados como termofílicos/termotolerantes porque foram capazes de crescer a 45 °C. Com a posterior caracterização e identificação de cada linhagem, será possível classificá-las como termofílicas ou termotolerantes.

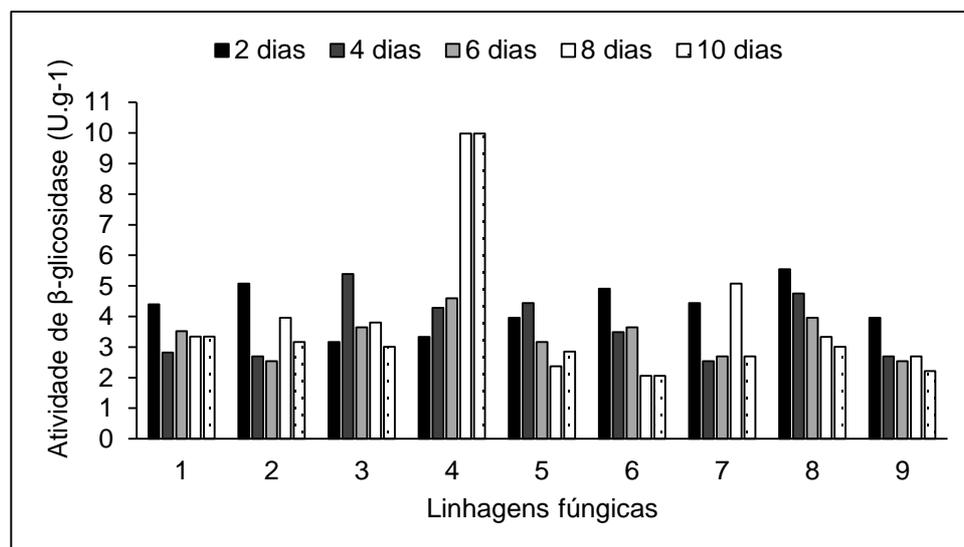


Figura 5. Atividade de β -glicosidase pelas linhagens fúngicas isoladas do solo. **Fonte:** Organizado pelos autores.

Industrialmente, a β -glucosidase tem várias aplicações, como na produção de biocombustíveis; na liberação de terpenos voláteis que contribuem para a composição aromática

de vinhos e no aumento do rendimento da extração de sucos (GARCIA et al., 2018). Essa enzima pode ser produzida por vários grupos microbianos. Porém, nos últimos anos, muitas pesquisas estão focando na seleção de microrganismos termofílicos e termotolerantes, especialmente do solo e de pilhas de compostagem. Esse fato se justifica porque as enzimas produzidas por estes grupos geralmente são mais termoestáveis e resistentes a agentes detergentes e proteolíticos, garantindo maior eficiência nos diferentes processos industriais nos quais atuam (MARTINS; MARTINS; MARTINS, 2019).

4. Conclusão

Na horta agroecológica, a atividade da enzima e a presença de bactérias no solo foram maiores que nos demais sistemas. A contagem de fungos mesófilos tem maior relação com o solo da área de cana-de açúcar e o solo oriundo da cultura do abacaxi apresentou os menores valores de contagem microbiana e atividade enzimática. A área que proporcionou maior quantidade de fungos termofílicos/termotolerantes isolados foi a horta agroecológica. Assim, os resultados obtidos mostraram que o tipo de cultivo (convencional ou agroecológico), bem como o tipo de cultura, afetaram a população de bactérias e fungos, a atividade de β -glicosidase no solo e o número de linhagens fúngicas isoladas com potencial de produção de β -glicosidase.

Agradecimentos

À Universidade do Estado de Minas Gerais, pela Bolsa de Iniciação Científica (Programa PAPq/UEMG) e pela Bolsa de Produtividade em Pesquisa (PQ).

Referências

- AHIRVAR, S.; SONI, H.; PRAJAPAT, B. P.; KANGO, N. Isolation and screening of thermophilic and thermotolerant fungi for production of hemicellulases from heated environments. **Micology**, v. 8, n. 3, p. 125-134, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/21501203.2017.1337657>
- BALD, D. R.Q.; RANGEL, C. P.; VARGAS, A. F.; GIRÃO, K. T.; PASSAGLIA, L. M. P. Microbiota do solo: a diversidade invisível e a sua importância. **Revista Bio Diverso**, v. 1, n.1, p. 101-131, 2021. Disponível em: <https://www.seer.ufrgs.br/index.php/biodiverso/article/view/120742/65552>. Acesso em 03 jan 2023.
- BHARDWAJ, N.; KUMAR, B.; AGRAWAL, K.; VERMA, P. Current perspective on production and applications of microbial cellulases: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 8, p. 1-34, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00447-6>
- 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/view/109/92/461-1>. Acesso em: 08 jan 2023.

CERDA, A.; ARTOLA, A.; BARRENA, R.; FONT, X.; GEA, T.; SÁNCHEZ, A. Innovative production of bioproducts from organic waste through solid-state fermentation. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 3, n. 63, p. 1-6, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00063>

EVANGELISTA, C. R.; PARTELLI, F. R.; FERREIRA, E. P. B.; CORRECHEL, V. Atividade enzimática do solo sob sistema de produção orgânica e convencional na cultura da cana-de-açúcar em Goiás. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 4, p. 1251-1262, 2012. DOI: 10.5433/1679-0359.2012v33n4p1251

FERREIRA, E. P. B.; STONE, L. F.; MARTINS-DIDONET, C. C. G. População e atividade microbiana do solo em sistema agroecológico de produção. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 48, n.1, p. 22-31, 2017. DOI: <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20170003>

GARCIA, N. F. L.; SANTOS, F. R. S.; GONÇALVES, F. A.; DA PAZ, M. F.; FONSECA, G. G.; LEITE, R. S. R. Production of β -glucosidase on solid-state fermentation by *Lichtheimia ramosa* in agroindustrial residues: Characterization and catalytic properties of the enzymatic extract. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 314-319, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.05.007>

GARCIA, N. F. L.; SANTOS, F. R. S.; BOCCHINI, D. A.; PAZ, M. F.; FONSECA, G. G.; LEITE, R. S. R. Catalytic properties of celulasases and hemicelulasases produced by *Lichtheimia ramosa*: potential for sugarcane bagasse saccharification. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 49-56, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.049>

LEE, L. S.; GOH, K. M.; CHAN, C. S.; ANNIE TAN, G. Y.; YIN, W. F.; CHONG, C. S.; CHAN, K. G. Microbial diversity of thermophiles with biomass deconstruction potential in a foliage-rich hot spring. **Microbiology Open**, v. 615, p. 1-13, 2018. DOI: 10.1002/mbo3.615

MALUCHE-BARETTA, C.R.D.; AMARANTE, C.V.T.; KLAUBERG-FILHO, O. Análise multivariada de atributos do solo em sistemas convencional e orgânico de produção de maçãs. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 1531-1539, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2006001000011>

MARTINS, M. E. M.; MARTINS, E. S.; MARTINS, H. L. Production and characterization of a thermostable β -glucosidase from *Myceliophthora heterothallica*. **Bioscience Journal**, v. 36, n. 1, p. 212-222, 2020. DOI: 10.14393/BJ-v36n1a2020-47758

MENDES, I. C.; SOUZA, D. M. G.; REIS JUNIOR, F. B. Bioindicadores de qualidade de solo: dos laboratórios de pesquisa para o campo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 32, p. 185-203, 2015. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/138889/1/Bioindicadores-de-qualidade.pdf>. Acesso em: 09 jan 2023.

MENDES, I. C.; SOUZA, D. M. G.; DANTAS, O. D.; LOPES, A. A. C.; REIS JUNIOR, F. B.; OLIVEIRA, M. I.; CHAER, G. M. Soil quality and grain yield: a win-win combination in clayey tropical Oxisols. **Geoderma**, v. 388, p. 1-10, 2021. DOI: 10.1016/j.geoderma.2020.114880.

MOGHIMIAN, N.; HOSSEINI, S. M.; KOOCH, Y.; DARKI, B. Z. Impacts of changes in land use/cover on soil microbial and enzyme activities. **Catena**, v. 157, p. 407-414, 2017. DOI: 10.1016/j.catena.2017.06.003.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Ed. UFLA, 2006. Disponível em: http://www.esalq.usp.br/departamentos/Iso/arquivos_aula/LSO_400%20Livro%20-%20Microbiologia%20e%20bioquimica%20do%20solo.pdf. Acesso em: 09 jan 2023.

PAZUTTI, L. V. B. **Desenvolvimento de metodologia de baixo custo para análise de β -glicosidasases em solos**. Leonardo Vitor Belo Pazutti; Guilherme Montandon Chaer. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 23p, 2012. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/113968/1/bot092-12.pdf>. Acesso em: 10 jan 2023.

RAMOS, M. L. G.; MENEGHIN, M. F. S.; PEDROSO, C.; GUIMARÃES, C. M.; KONRAD, M. L. F. Efeito dos sistemas de manejo e plantio sobre a densidade de grupos funcionais de microrganismos, em solo de cerrado. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, p. 58-68, 2012. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/54855/1/bj.pdf>. Acesso em: 10 jan 2023.

- RAMOS, M. R.; UHLMANN, A.; JUSTEN, L.; FREIRE, T. M.; PANTA, D. A. S. Uso do solo e a estacionalidade climática afetam os atributos biológicos do solo? **Agroecossistemas**, v. 12, n. 1, p. 178-200, 2020. Disponível em: <https://periodicos.ufpa.br/index.php/agroecossistemas/article/view/7474/6887>. Acesso em: 11 jan 2023
- RECH, M.; PANSERA, M. R.; SARTORI, V. C.; RIBEIRO, R. T. S. Microbiota do solo em vinhedos agroecológico e convencional e sob vegetação nativa em Caxias do Sul, RS. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 8, n. 3, p. 141-151, 2013. Disponível em: <https://revistas.aba-agroecologia.org.br/rbagroecologia/article/view/13264/pdf>. Acesso em: 06 jan 2023.
- RIGOLDI, F.; DONINI, S.; REDAELLI, A.; PARISINI, E.; GAUTIERI, A. Review: Engineering of thermostable enzymes for industrial applications. **APL Bioengineering**, v. 2, n. 1, p. 1-18, 2018. DOI: 10.1063/1.4997367
- RODRIGUES, R. N.; REIS JUNIOR, F. B.; LOPES, A. A. C.; ROCHA, O. C. GUERRA, A. F.; VEIGA, A. D.; MENDES, I. C. Soil enzymatic activity under coffee cultivation with different water regimes associated to liming and intercropped *Brachiaria*. **Ciência Rural**, v. 52, n. 3, p. 2-12, 2022. DOI: <https://doi.org/10.590/0103-8478cr20200532>
- ROSSET, J. S.; COELHO, G. F.; GRECO, M.; STREY, L.; GONÇALVES JUNIOR, A. C. Agricultura convencional versus sistemas agroecológicos: modelos, impactos, avaliação da qualidade e perspectivas. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 13, n. 2, p. 80-94, 2014. DOI: <https://doi.org/10.18188/sap.v13i2.7351>
- SANTOS, T. E. B.; SOUZA, A. G. V.; SILVA, K. D.; BUENO, L. L. Agricultura orgânica e a microbiota do solo. **Revista Agrotecnologia**, v. 11, n. 1, p. 95-102, 2020. Disponível em: <https://www.revista.ueg.br/index.php/agrotecnologia/article/view/9977>. Acesso em: 10 jan 2023.
- SILVA, H. S.; CHAVES, J. S.; NASCIMENTO, J. P. S.; MATOS, S. M.; NETO, A. F. B.; LEITE, J. L.; PEREIRA, H. R.; BRITO, W. A. Atividade microbiana no solo em sistema de produção consorciado. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 14, p. 1-7, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i14.22366>
- SOUTO, P.C.; BAKKE, I.A.; SOUTO, J.S.; OLIVEIRA, V.M. Cinética da respiração edáfica em dois ambientes distintos no semiárido da Paraíba, Brasil. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 3, p. 52-58, 2009. Disponível em: <https://periodicos.ufersa.edu.br/caatinga/article/view/1182/pdf>. Acesso em: 17 jan 2023.
- STATSOFT, Inc. **Statistica** (data analysis software system), version 13.3. 2021. Disponível em: <https://statistica.software.informer.com/13.0/>. Acesso em: 28 dez 2022.
- STOTT, D. E. ANDREWS, S. S.; LIEBIG, M. A.; WIENHOLD, B. J.; KARLEN, D. L. Evaluation of β -glucosidase activity as a soil quality indicator for the soil management assessment framework. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 74, n. 1, p. 106-119, 2010. DOI: <https://doi.org/10.2136/sssaj2009.0029>
- TSCHARNTKE, T.; CLOUGH, Y.; WANGER, T.C.; JACKSON, L.; MOTZKE, I.; PERFECTO, I.; VANDERMEER, J.; WHITBREAD, A. Global food security, biodiversity conservation and the future of agricultural intensification. **Biological Conservation**, v. 151, p. 53-59, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2012.01.068>
- WINQVIST, C.; AHNSTRÖM, J.; BENGTTSSON, J. Effects of organic farming on biodiversity and ecosystem services: taking landscape complexity into account. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v. 1249, p. 191-203, 2012. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2011.06413.x