

## **USO DO TESTE DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS COMO NOVA FERRAMENTA PARA AVALIAÇÃO DA BIODIVERSIDADE MICROBIANA DO SOLO**

Samuel Ribeiro Figueiredo<sup>1</sup>

### **INTRODUÇÃO**

Nos últimos anos, tem sido crescente o interesse particular nas relações entre biodiversidade, aqui definida simplesmente como o número de espécies presentes em um sistema e, função dos microrganismos no solo (Nannipieri et.al., 2003), sendo esta função definida como capacidade de mineralização da matéria orgânica e ciclagem biogeoquímica de nutrientes.

Existe agora um crescente corpo de evidências experimentais que demonstram que muitos microrganismos são funcionalmente redundantes e que as características funcionais e metabólicas de determinados grupos são tão importantes quanto o número de espécies inseridas em determinado ecossistema (Andren & Balandreau, 1999; Bardgett & Shine, 1999).

Segundo a teoria da insureição de Leouou et.al. (2001), um mínimo de espécies seriam necessárias para manter as funções do solo mediadas pelos microrganismos e que, é necessário um grande número de espécies para manter a estabilidade dos processos dentro de mudanças de ambiente. Ou seja, somente um largo espectro de biodiversidade é capaz de manter a estabilidade de um sistema manejado antrópicamente, mesmo sendo este manejo de forma orgânica e alicerçada na agroecologia. As mudanças, transformações e respostas das populações de microrganismos devem ser estudadas dentro de cada forma de manejo agroecológico.

---

1. Engenheiro Agrônomo, aluno do programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, [s.r.figueiredo@bol.com.br](mailto:s.r.figueiredo@bol.com.br)

## DESENVOLVIMENTO

Entretanto, as relações entre biodiversidade e funcionalidade dos microrganismos do solo são ainda pouco estudadas e são pobremente entendidas. Estas relações, não foram, portanto, claramente estabelecidas.

O fato disto acontecer, em parte é conceitual e em parte é metodológico. Conceitual, pois a consciência de agroecológica ainda ecoa longe em centros de pesquisa, difusão de tecnologias e setores produtivos ainda alicerçados na química sintética e mecanização intensiva da chamada revolução verde. Aonde o solo não é compreendido como um microhabitat no qual podem estar inseridos até 6000 diferentes genomas bacterianos por grama de solo do tamanho de *Escherichia coli* como uma unidade (Torvik et.al., 19996), embora isto esteja mudando gradativamente.

Metodológico devido a diversas limitações dos métodos empregados atualmente, embora válidos, para aferir a biodiversidade e funcionalidade dos microrganismos. Como por exemplo, temos, para estudos de biodiversidade, o isolamento e contagem do número mais provável de microrganismos em placas contendo meios de cultura nutritivos específicos e semi-específicos, embora tenha eficácia para diversos grupos importantes do solo como os relacionados à fixação biológica de nitrogênio, tem grandes limitações, pois estima-se que apenas de 1 a 2% do total de microrganismos do solo, desenvolvem-se em meios de cultura sintéticos produzidos até o momento e estes procedimentos são extremamente laboriosos.

Outra forma de avaliar o solo é pela quantificação de enzimas, que fornecem valiosas informações sobre a qualidade do solo. Entretanto, devem ser consideradas com cautela quando estas são relacionadas como provenientes da atividade ou função mediada por microrganismos, já que diversas enzimas do solo também existem fora da célula e muitos métodos não distinguem entre enzimas intracelular e extracelular (Nannipieri et.al., 2003).

Um método que avalia muito bem a dinâmica de nutrientes do solo é a determinação do C, N, P e S microbianos por técnicas de fumigação conhecida como avaliação da biomassa microbiana. Constituindo-se uma visão holística da população microbiana que tem sido correlacionada com diversos eventos como acúmulo da matéria orgânica do solo, estabilidade de agregados, acúmulo de nutrientes em grãos e qualidade do solo. Entretanto, estima-se que cerca de 15% a 30% do total da biomassa microbiana é metabolicamente ativa estando o restante em estado de dormência, sendo interessante para um estudo mais aprofundado estimar e identificar esta população ativa.

Considerada como a grande caixa preta do solo, para acessar as diversidades genéticas tem sido reportados vários métodos para formação de perfis filogenéticos de bactérias, tais como ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*), RISA (*Ribosomal Intergenic Analysis*), T/DGGE (*Terminal/Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*) e SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*), com posterior elucidação e sequenciamento de bandas provenientes de géis de agarose, acrilamida ou poliacrilamida. Obtendo-se a partir daí índices de riqueza, diversidade do solo e *clusters*, além de possibilidade de identificação de espécies que figuram em determinados perfis e outros não em função do manejo do solo ou do ecossistema ao qual a comunidade microbiana está inserida. A maioria destes métodos estão baseados na extração do DNA e posterior PCR e possuem vantagens e desvantagens. Entre as vantagens há a possibilidade de se identificar espécies que não se desenvolvem em meios de cultura e se ter idéias sobre a diversidade do solo, entretanto em ambientes com até 6000 genomas por grama de solo nestes perfis aparecem apenas no máximo 41 espécies que podem ou não ser as espécies dominantes.

O teste de isótopos estáveis, apresenta-se como uma ferramenta valiosa para se obter a ligação entre a função e identidade de microrganismos ativos em seu ambiente natural diretamente do que qualquer outra forma até então possível (Friedrich, 2004). Constituindo-se na mais importante ferramenta em estudos de ecologia microbiana até o presente momento.

Desenvolvido inicialmente por Radajewski et.al. (2000), o teste de isótopos estáveis baseia-se em substratos marcados isotopicamente com  $^{13}\text{C}$  para obtenção de DNA marcado provenientes de grupos de microrganismos em amostras ambientais. Apenas microrganismos metabolicamente ativos são capazes de assimilar o substrato e ter  $^{13}\text{C}$ -DNA sendo que microrganismos inativos possuem um normal  $^{12}\text{C}$ -DNA. As frações  $^{13}\text{C}$ -DNA e  $^{12}\text{C}$ -DNA são separadas por ultracentrifugação ( $60.000 \times g$ ) sobre um gradiente de cloreto de cézio. Portanto, apenas as frações metabolicamente ativas conseguem incorporar o substrato  $^{13}\text{C}$  para dentro do material celular e, então, podemos isolar e caracterizar as duas frações, leve e pesada e analisá-las utilizando ampliações de genes filogenéticos como as bibliotecas 16S rRNA ou de genes funcionais como os *nifH* que codificam para o complexo da nitrogenase presente em bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico. Identificando desta forma quais são e qual o percentual de microrganismos ativos, formando um novo compartimento como a matéria orgânica e a biomassa microbiana, para estimar a dinâmica de nutrientes no solo monitorar e prever possíveis impactos ambientais.

### CONCLUSÕES

As relações entre diversidade e funcionalidade de microrganismos ainda não estão completamente estabelecidas e corretamente elucidadas.

Para averiguar a dinâmica de nutrientes no solo, bem com sua qualidade e sustentabilidade, é necessário estudar a dinâmica dos compartimentos do solo, como a matéria orgânica (frações leve e grosseira), biomassa microbiana e agora as relações entre o  $^{13}\text{C}$ -DNA e  $^{12}\text{C}$ -DNA. Como novo “pool” do solo, as relações entre  $^{13}\text{C}$ -DNA e  $^{12}\text{C}$ -DNA tem grande potencial como bioindicador, pois revela a quantidade de microrganismos que estão metabolicamente ativos e de contrapartida além da quantidade, por técnica de biologia molecular pode-se identificar quais são estas espécies.

O teste de isótopos estáveis, portanto, é a mais promissora ferramenta para estudos de ecologia microbiana na atualidade, sendo de igual potencial para estudos mais aprofundados dentro da agroecologia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andren, O.; Balandreau, J. Biodiversity and ecosystem functioning – from black box to can of worm? **Applied Soil Ecology**, v. 13, p. 105-108, 1999.
- Bardgett, R.D.; Shine, A. Linkages between plant litter diversity, soil microbial biomass and ecosystem function in temperate grassland. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, p. 101-108.
- Friedrich, M. **Linking structure and function of microbial communities**. On-line ([http://www.uni-marburg.de/mpi/friedrich/friedrich\\_res.html](http://www.uni-marburg.de/mpi/friedrich/friedrich_res.html)).
- Loreau, M. et.al. Biodiversity and soil functioning current knowledge and future challenges. **Science**, v. 294, p. 804-808.
- Nannipieri, P. et.al. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, v. 54, p. 655-670, 2003.
- Radajewski, S. et.al. Stable isotope probing as a tool in microbial ecology. **Nature**, v. 403, p. 646-699, 2000.
- Torsvik, Sorheim, R.; Goksoyr, J. Total bacterial diversity in soil and sediment communities – a review. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 17, p. 170-178, 1996.

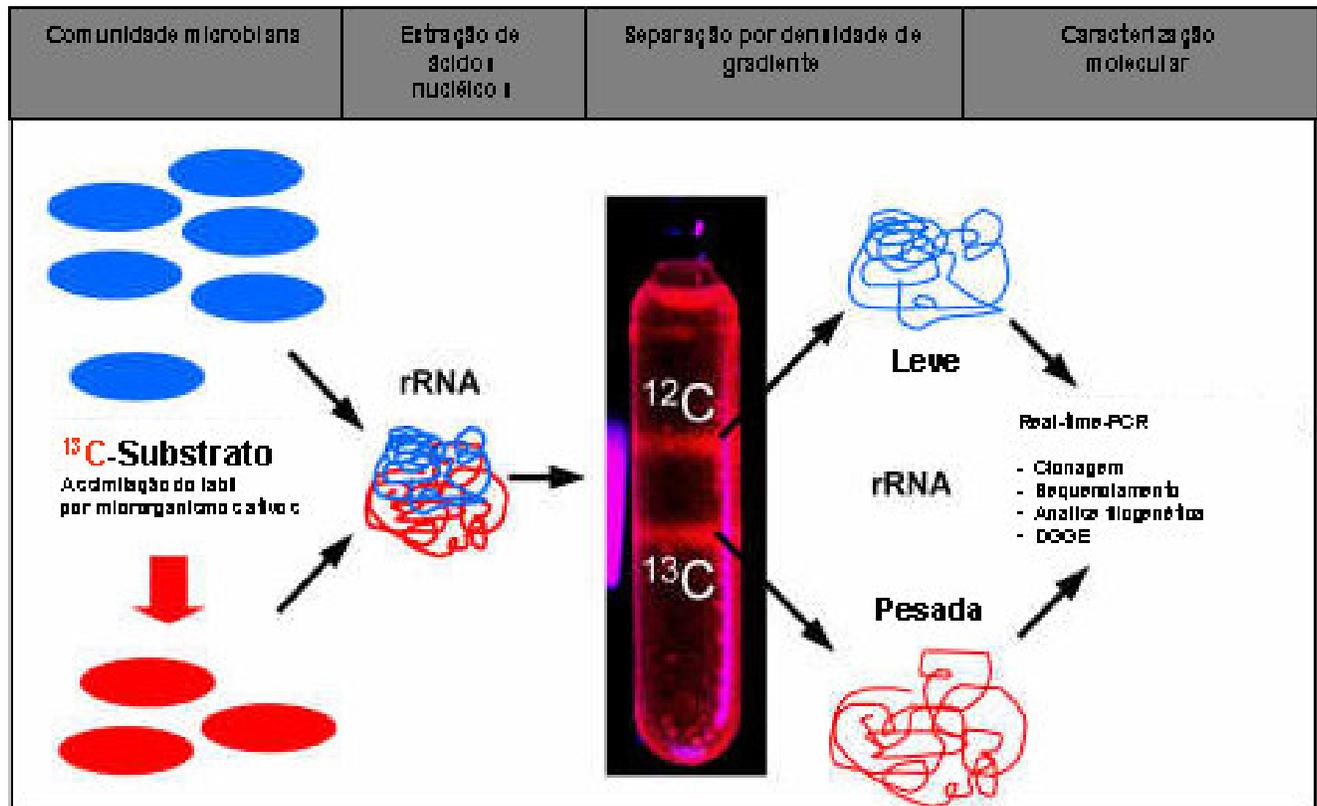


Figura 1. Teste de isótopos estáveis de ácidos nucléicos. Representação esquemática de etapas envolvidas no teste de isótopos estáveis de ácidos nucléicos. 1. Comunidade marcada isotopicamente, incorporação de substratos marcado por  $^{13}\text{C}$  por microrganismos ativos estimulados pela adição de substratos próximos as condições naturais. 2. Extração de ácidos nucléicos de toda a comunidade microbiana. 3. Separação por gradiente de densidade, isocentrifugação apresenta duas fases, separa as frações pesada de  $^{13}\text{C}$ -rRNA (ou DNA) de leve  $^{12}\text{C}$ -rRNA (ou DNA). 4. Caracterização molecular dos ácidos nucléicos leves e pesados são comparativamente caracterizados por real-time PCR amplificação de 16S rRNA (ou algum marcador de gene funcional), clonagem/sequenciamento e análises filogenéticas (T-RFLP, DGGE). Adaptado de Friedrich, 2004.