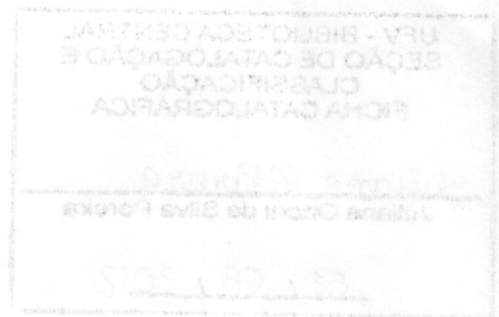


NAYLOR DANIEL DA COSTA AGUIAR

Impacto do isotiocianato de alila sobre a comunidade microbiana e indicadores microbiológicos do solo

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2012



**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

A282i  
2012

Aguiar, Naylor Daniel da Costa, 1982-  
Impacto do isotiocianato de alila sobre a comunidade  
microbiana e indicadores microbiológicos do solo / Naylor  
Daniel da Costa Aguiar. – Viçosa, MG, 2012.  
ix, 122f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Rosângela D'Arc de Lima Oliveira.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Nematoda. 2. Fitopatologia. 3. Nematoda - Controle.  
4. Mostarda. 5. Ecologia do solo. 6. Micro-organismos  
fitopatogênicos. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 592.57

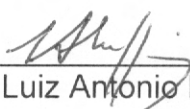
NAYLOR DANIEL DA COSTA AGUIAR

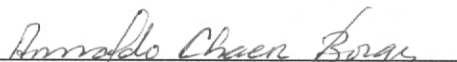
Impacto do isotiocianato de alila sobre a comunidade microbiana  
e indicadores microbiológicos do solo

Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Fitopatologia, para  
obtenção do título de *Doctor Scientiae*.


APROVADA: 29 de Fevereiro de 2012.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Marcos Rogério Tótola  
(Coorientador)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Luiz Antonio Maffia

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Arnaldo Chaer Borges

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Guilherme Montandon Chaer

  
\_\_\_\_\_  
Profª Rosângela D'Arc de Lima Oliveira  
(Orientadora)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pai de infinita bondade.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização do Programa de Pós- Graduação.

À Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

À professora Rosângela D'Arc de Lima Oliveira, pela orientação, dedicação, ensinamentos e amizade.

Aos professores Marcos Rogério Tótola, Arnaldo Chaer Borges, Luiz Antônio Maffia e ao pesquisador Guilherme Montandon Chaer, pelas sugestões e informações necessárias à correção deste trabalho.

Aos colegas da Nematologia e Ecologia Microbiana pelo convívio, amizade e ensinamentos durante o desenvolvimento desta tese de Doutorado, em especial aos amigos Paulo, Júlio e Marcelo do laboratório de ecologia microbiana.

Agradeço a minha família pela paciência, carinho, incentivo e confiança depositado em mim para execução deste trabalho.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

Naylor Daniel da Costa Aguiar, filho de Nadir Aparecido da Costa Aguiar e Lourdes Aparecida Rossi da Costa Aguiar, nasceu em 05 de dezembro de 1982, em Monte Alto, Estado de São Paulo.

Em 2001, iniciou o Curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em 05 de maio de 2006.

Em maio de 2006, iniciou o Curso de Mestrado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Nematologia e defendendo a dissertação em 25 de fevereiro de 2008.

Em março de 2008, iniciou o Curso de Doutorado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Nematologia e Ecologia Microbiana, submetendo-se à defesa da tese em 29 de fevereiro de 2012.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	viii
1. Introdução geral .....	1
2. Revisão de literatura.....	2
2.1. Brássicas no controle de fitopatógenos .....	2
2.2. Modo de ação dos isotiocianatos .....	5
2.3. O solo.....	10
2.4. Indicadores da qualidade do solo.....	11
2.5. Indicadores Microbiológicos do solo .....	11
2.5.1. Biomassa microbiana do solo.....	11
2.5.2. Respiração microbiana do solo .....	12
2.5.3. Enzimas do solo.....	12
2.5.4. Diversidade microbiana .....	13
2.6. Alterações na comunidade microbiana no solo .....	14
3. Referencias bibliográficas.....	18
Capítulo 1 - Alteração da comunidade microbiana em três texturas diferentes pela aplicação do isotiocianato de alila. ....	29
1. Introdução .....	29
2. Material e métodos .....	30
2.1. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	31
2.2. Carbono da biomassa microbiana (CBM) .....	32
2.3. Respiração basal.....	33
2.4. Atividade enzimática.....	33
2.4.1. Fosfatase ácida .....	33
2.4.2. Fosfatase básica .....	33
2.4.3. $\beta$ – glicosidase .....	34
2.4.4. Nitrificação potencial.....	34
2.5. Análise da diversidade genética .....	35
2.5.1. Extração de DNA total do solo .....	35
2.5.2. PCR .....	36
2.5.3. Microrganismos marcadores do DGGE.....	37
2.5.4. DGGE – Eletroforese em gel com gradiente desnaturante.....	37
2.5.5. Processamento das imagens dos géis de DGGE.....	40
2.5.6. Análises de agrupamento .....	40

2.6. Extração de nematóides do solo.....	41
3. Resultados .....	41
4. Discussão .....	48
5. Conclusão .....	52
6. Referências Bibliográficas .....	53
Capítulo 2 - Efeito da dose e tempo de fumigação com Isotiocianato de alila na comunidade microbiana do solo. ....	62
1. Introdução .....	62
2. Material e métodos .....	63
2.1. Análises microbiológicas.....	64
3. Resultados .....	64
4. Discussão .....	72
5. Conclusões .....	76
6. Referencias Bibliográficas .....	77
Capítulo 3 - Recuperação da atividade microbiana no solo após tratamento com isotiocianato de alila.....	82
1. Introdução .....	82
2. Material e métodos .....	83
2.1. Aplicação do ITCA e Terbufós. ....	83
2.2. Análises microbiológicas.....	84
3. Resultados .....	84
4. Discussão .....	109
5. Conclusão .....	115
6. Referências Bibliográficas .....	116
Conclusões Gerais.....	122

## RESUMO

AGUIAR, Naylor Daniel da Costa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Impacto do isotiocianato de alila sobre a comunidade microbiana e indicadores microbiológicos do solo.** Orientadora: Rosângela D'Arc de Lima Oliveira. Coorientadores: Onkar Dev Dhingra e Marcos Rogério Tótola.

O uso de produtos químicos sintéticos ou de origem vegetal no controle de fitonematóides é de fundamental importância para viabilizar o uso de áreas já infestadas com nematoides para a implantação de lavouras ou para a formação de mudas saudáveis. A recomendação é que a aplicação dos referidos produtos somente seja autorizada após se comprovar que eles não afetem a sustentabilidade do ecossistema. E isso requer estudos sobre o impacto do produto, fumigantes ou não, sobre a microbiota do solo. A hipótese de que a diversidade da microbiota do solo se restabelece e assegura a homeostase do solo anterior à aplicação do isotiocianato de alila (ITCA) foi testada no presente trabalho. As variáveis para o estudo foram definidas como: solo com três texturas, de argilosa a arenosa, doses e tempo de fumigação do solo com o ITCA. O impacto do fumigante ITCA sobre a microbiota, avaliado pela mensuração das atividades microbiana e enzimática e acompanhado por análises da diversidade genética de fungos, bactérias e nematoides no solo pelo período de um mês após a aplicação do isotiocianato de alila, demonstrou que nas três texturas estudadas ocorreu redução do carbono da biomassa (CBM) e da atividade da fosfatase ácida, e aumento na da fosfatase básica. A atividade de  $\beta$ -glicosidase após a aplicação do ITCA aumentou ( $p \leq 0,05$ ) em solos de textura arenosa e média e foi reduzida no solo de textura argilosa, enquanto a nitrificação potencial e a respiração foram reduzidas ( $p \leq 0,05$ ) no solo de textura arenoso e aumentado no solo de textura argilosa e média. A comunidade bacteriana do solo não foi alterada pela aplicação do ITCA, como evidenciado pelo 'fingerprint' e índices de diversidade, equitabilidade e riqueza, porém a de fungos registrou a existência de pequeno distúrbio. A aplicação do ITCA reduziu a comunidade de nematoides do solo ( $p \leq 0,05$ ) e o efeito da dose e tempo de tratamento resultou em maior redução na atividade dos microrganismos ( $p \leq 0,05$ ) quando da fumigação por 10 dias. Com o tempo de fumigação por 10 dias causou redução na atividade das fosfatases, ácida e

básica, da  $\beta$ -glicosidase e de carbono da biomassa ( $p \leq 0,05$ ), enquanto a respiração basal foi maior na dose de 120  $\mu\text{L}$  de ITCA por quilo de solo, dose em que a taxa de nitrificação potencial aumentou. O fingerprint e os índices mostraram que as comunidades bacterianas e fúngicas do solo não foram afetadas. No período de um mês não ocorreu recuperação da atividade de todas as enzimas no solo de textura média e argilosa. A respiração basal dos microrganismos foi aumentada logo após a aplicação do ITCA e do nematicida, sendo que nos solos de textura média e argilosa ela voltou à sua condição natural aos 14 dias. Aos 28 dias, pequenas variações foram observadas no fingerprint de bactérias e fungos do solo. Não houve perda da diversidade de fungos e bactérias nos solos tratados com ITCA e Terbufós. De maneira geral, a utilização do ITCA para o controle de nematoide não afetou de forma expressiva a atividade de fungos e bactérias do solo, uma vez que o seu impacto foi inexpressivo sobre a comunidade microbiana.

## ABSTRACT

AGUIAR, Naylor Daniel da Costa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Microbial community impact by allyl Isothiocyanate application and soil microbiological indicators.** Adviser: Rosângela D'Arc de Lima Oliveira. Co-advisers: Onkar Dev Dhingra and Marcos Rogério Tótola.

The use of chemicals, synthetic or *substance originated* from natural plant, to control nematodes is essential for the infested crop management or for the production of healthy seedlings. The recommendation is that the application of these products is only authorized when it is demonstrated that they do not result in damage to the ecosystem sustainability. Studies about the impact of these products on the soil microbial community are required. The hypothesis that the soil microbial diversity is restored and ensures the natural homeostasis of the soil after allyl isothiocyanate (ITCA) application was tested in this study. The studied variables were defined as: three different soil textures, clayey to sandy, doses and timing of soil fumigation with ITCA. The impact of the fumigant ITCA on the soil microbial, evaluated by the measurement of microbial and enzymatic activities and through genetic diversity of fungi, bacteria and nematodes analysis in the soil for one month after the allyl isothiocyanate application, showed that in the three textures of soil there was a reduction of the microbial biomass carbon (MBC) and also in the activity of the acid phosphatase enzyme, and an increase in the basic phosphatase activity. The  $\beta$ -glucosidase activity after the ITCA ( $p \leq 0.05$ ) increased in sandy and medium textured soils, and was reduced in the clayey soil, while potential nitrification and respiration were reduced ( $p \leq 0.05$ ) in the sandy soil texture and increased in the clayey and medium soils. The soil bacterial community was not affected by ITCA application, as evidenced by the fingerprint and diversity, evenness and richness, but the fungi community exhibited a small disturbance. The ITCA application reduced the soil nematode community ( $p \leq 0.05$ ) and the effect of the dosage and treatment time resulted in greater reduction in the microorganisms activity ( $p \leq 0.05$ ) when considered the fumigation for 10 days. Fumigation for 10 days caused a reduction in the activity of phosphatases, acid and basic, of the  $\beta$ -glucosidase and carbon biomass ( $p \leq 0.05$ ), while the basal respiration was higher at a dosage of 120 mL of ITCA per kilogram of soil,

dosage in which nitrification potential rate increased. The fingerprint and indexes of diversity and dominance show that the bacterial and fungus communities in soil were not affected. In one month after ITCA application there was no total activity recovery of the enzymes in the medium and clayey soil texture. The microorganisms respiration increased immediately after ITCA application. Considering that in medium and clayey soils it got back to the natural condition on the fourteenth day, but it did not occur in sandy soils. At 28 days, small changes were seen in bacteria and fungi fingerprint of the soil. There was no loss of fungi and bacteria diversity in the soils treated with ITCA. In general, the use of ITCA for controlling nematodes not affected significantly the activity of fungi and bacteria in the soil, because the impact on the microbial community was low.

## 1. Introdução geral

Embora nematóides sejam habitantes naturais dos solos, eles são prejudiciais a muitas culturas de interesse econômico, às quais podem causar severos danos, especialmente em plantas que se propagam por mudas. A busca de medidas que controlem nematóides é um desafio contínuo. Isto se deve ao fato deles passarem parte ou toda a sua vida no ambiente do solo, onde complexas interações físicas, químicas e biológicas ocorrem, e muitas vezes impedem ou reduzem a eficiência de práticas que visem à sua eliminação.

Em culturas como o cafeeiro, cuja lavoura é implantada no campo a partir de mudas formadas em viveiros, esses organismos são capazes de prejudicar a formação da nova planta e, ainda, usá-la na sua disseminação de uma região para outra (Boneti, Ferraz *et al.*, 1982; Tronconi, Ferraz *et al.*, 1986).

Para prevenir a introdução do patógeno em áreas indenidas, é necessária a utilização de mudas saudáveis, o que pode ser conseguido produzindo-as em solo de barranco ou terriço associado ao tratamento químico.

Os produtos químicos mais usados para a fumigação de solos ou substratos para a produção de mudas são o Metam sódico (Sodium methylaminomethaneditioate), Isotiocianato de metila e Brometo de metila (Duniway, 2002). O brometo de metila, principal fumigante usado no controle de nematóides, foi proibido mundialmente no ano de 1998 em razão do efeito negativo sobre a camada de ozônio (Unep, 1998). De acordo com o Protocolo de Montreal, o Brometo de metila deveria ter sua produção e comercialização encerrada em 2005 nos países desenvolvidos, mas seu fornecimento só seria interrompido em 2015 nos países em desenvolvimento. O Brasil antecipou a retirada do brometo de metila do mercado em dezembro de 2006, ficando sua aplicação restrita a fins quarentenários (Mapa, 2005).

Plantas da família Brassicaceae são também estudadas quanto ao potencial de uso para controle de organismos fitopatogênicos. A incorporação de partes de brássicas a substratos para cultivo de plantas, visando ao controle de fitonematóides, não é assunto recente (Ellenby, 1945; Mojtahedi, Santo *et*

*al.*, 1991; Potter, Davies *et al.*, 1998), contudo, a avaliação da eficiência de derivados de mostardas (*Brassica* spp.) para tratamento de substratos no sistema de produção de mudas é atual e os resultados têm se mostrado promissores, uma vez que os níveis de controle de fitopatógenos do solo são considerados adequados (Lima, 2006; Goulart, 2007; Aguiar, 2008; Oliveira, Dhingra *et al.*, 2011).

O ambiente solo é considerado como complexo em razão da ocorrência de interações biológicas simultâneas, inclusive com a participação de microrganismos benéficos. Estudos preliminares conduzidos nos Laboratórios do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa mostraram que os produtos oriundos da semente (torta) e folhas de *Brassica juncea* causam alterações na comunidade microbiana do solo, aumentam a população de bactérias e fungos do solo (Lima, 2006; Schurt, 2006). Todavia, a natureza das alterações não foi ainda esclarecida. No presente trabalho foi testada a hipótese de que a diversidade da microbiota do solo é restabelecida após a aplicação do isotiocianato de alila (ITCA) e do nematicida, o que assegura a homeostase do solo a condição anterior à aplicação de produtos de *B. juncea* para o controle de fitonematóides. Portanto, objetivou-se avaliar o impacto da aplicação do ITCA sobre a microbiota do solo. Especificamente, objetivou-se avaliar o efeito: I - do ITCA na comunidade microbiana de solos de diferentes texturas; II - dose do ITCA X tempo de fumigação aplicado ao substrato na comunidade microbiana do solo; III - da aplicação do ITCA na atividade microbiana do solo ao longo do tempo.

## **2. Revisão de literatura**

### **2.1. Brássicas no controle de fitopatógenos**

Os pesticidas fumigantes foram usados por muitos anos no controle de fitopatógenos presentes no solo. Contudo, face a recente proibição do uso do brometo de metila em 1998 e outros produtos, foram intensificadas as pesquisas no Brasil sobre alternativas para substituir os fumigantes sintéticos por compostos bioativos derivados de plantas. Esses compostos ou plantas que os contenham podem ser utilizados como biopesticidas, pulverizados ou

incorporados ao substrato de crescimento de plantas (Akhtar e Alam, 1993). Com a decomposição do material orgânico incorporado pode haver estímulo à atividade microbiana, inclusive favorecimento de antagonistas a nematóides (Bridge, 1996), e liberação de substâncias voláteis que atuam sobre patógenos presentes no substrato, processo esse denominado biofumigação (Unep, 1998). Diversas plantas são conhecidas por apresentarem substâncias com efeito nematicida e, ou nematostático (Ferraz e Freitas, 2004), dentre essas as da família Brassicaceae, em razão de seu potencial para controle de fungos, bactérias e nematóides de solo (Drobnica, Zemanova *et al.*, 1967; Brown e Morra, 1997; Chen, Han *et al.*, 2002; Dayan, Cantrell *et al.*, 2009; Vig, Rampal *et al.*, 2009). Algumas plantas dessa família produzem um grupo de metabólitos secundários, denominados glicosinolatos (Mojtahedi, Santo *et al.*, 1993; Potter, Davies *et al.*, 1998), que se constitui de um grupo de  $\beta$ -D tioglucosídeos que contêm enxofre em sua cadeia e que se distinguem entre si pela diferença em sua cadeia lateral orgânica (grupo R). Com base nestas diferenças, os glicosinolatos são agrupados em alifáticos, aromáticos e na forma indol (Zasada e Ferris, 2003). São armazenados nos vacúolos das células e encontrados em todos os tecidos da planta (Kirkegaard e Sarwar, 1998; Vig, Rampal *et al.*, 2009). Quando o tecido é rompido, glicosinolatos entram em contato com a mirosinase (tioglucosídeo glucohidrolase, EC 3.2.3.1), armazenada em compartimento distinto nas células, e resulta em processo de hidrólise e formação de nitrilas, epitionitrilas, tiocianatos e/ou isotiocianatos (Zasada e Ferris, 2003). A Figura 1 ilustra a conversão do glicosinolato em isotiocianato.

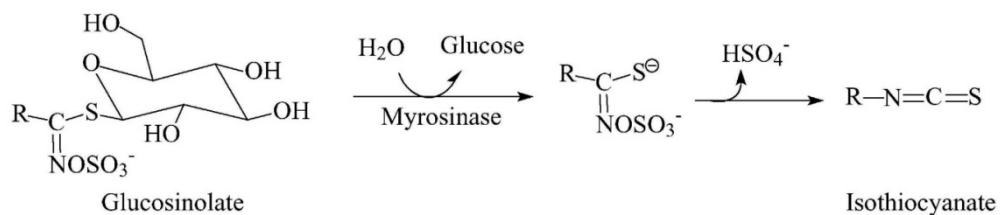


Figura 1 – Conversão de glicosinolato a isotiocianato pela enzima mirosinase. Fonte Zhang (2004).

Isotiocianatos (ITCs) são compostos voláteis e os mais tóxicos subprodutos da hidrólise dos glicosinolatos (Brown e Morra, 1996; Smolinska, Morra *et al.*, 1997). Já foram identificados mais de 20 diferentes ITCs (Figura 2), dentre outros aleloquímicos potenciais oriundos de *Brassica napus*, *Brassica hirta*, *Brassica campestris*, *Brassica juncea*, *Brassica nigra*, dentre outras Zhang (2004).

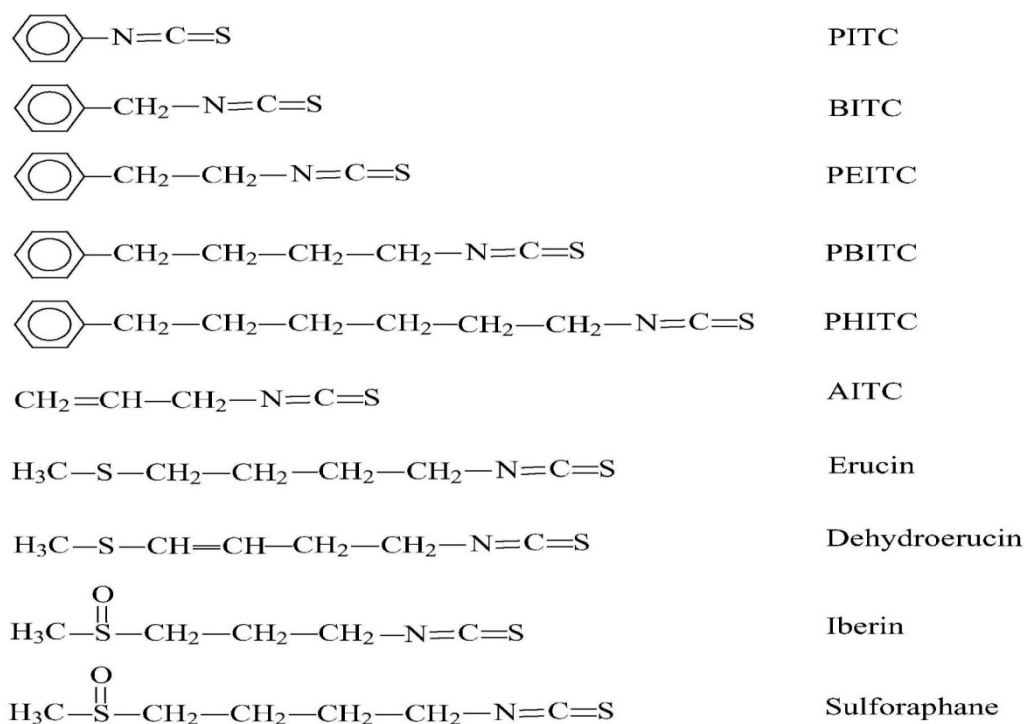


Figura 2 – Exemplos de isotiocianatos (ITC) formados pela hidrólise de glicosinolatos: PITC (Phenyl ITC), BITC (Benzyl ITC), PEITC (Phenethyl ITC), PBITC (4-Phenylbutyl ITC), PHITC (6-Phenylhexyl ITC), AITC (Allyl ITC), Erucin, Dehydroerucin, Iberin e Sulforaphane. Fonte: Zhang (2004).

A incorporação de material vegetal oriundo de *Brassica oleracea* e outras brassicas ao solo são reportadas na literatura redução da população de vários fitonematóides (Mojtahedi, Santo *et al.*, 1993; Potter, Davies *et al.*, 1998), com a dose de 5,2 Kg de repolho picado por um m<sup>2</sup> de solo resultou na redução de 54% de *Nacobbus aberrans* na cultura do tomate (Franco-Navarro, Del Prado-Vera *et al.*, 2002).

A literatura registra resultados satisfatórios no controle dos fungos de solo *Fusarium oxysporum* (Smolinska, Morra *et al.*, 2003), *Rhizoctonia solani* e *Pythium* spp. (Chung, Huang *et al.*, 2002; Cohen, M.F., Yamasaki, H. *et al.*, 2005), de bactérias (Charron, Sams *et al.*, 2002) e também no controle da germinação de sementes de plantas invasoras (Brown e Morra, 1996).

No Brasil, a *B. juncea* é estudada visando ao controle de fitonematóides, fungos e insetos desde 2004 (Dhingra, Costa *et al.*, 2004). Em grãos armazenados, a aplicação de óleo essencial oriundo da *Brassica rapa* resultou em controle de *Sitophilus zeamais* (Campos, Faroni *et al.*, 2004; Costa, Sousa *et al.*, 2006). Efeito nematicida foi verificado na mortalidade de juvenis de *Heterodera glycines*, *M. incognita*, *M. mayaguensis*, *M. javanica* (Oliveira, Dhingra *et al.*, 2011) e *M. exigua* (Goulart, 2007) pelo uso de farinhas de folhas e sementes, de tortas e ainda do óleo essencial da mostarda (OEM).

Isotiocianatos obtidos na indústria química foram amplamente estudados para o controle de fitopatógenos, a exemplo do efeito de diferentes ITCs sobre *Tylenchulus semipenetrans* e *M. javanica*. Os autores concluíram que benzil (2-feniletil) e alil (2-propanil) isotiocianato foram os mais promissores para o manejo desses nematóides parasitas de plantas (Zasada e Ferris, 2003). A dose de 0,1 µL/mL de 2-feniletil-isotiocianato resultou em controle de *Pratylenchus neglectus* (Potter, Davies *et al.*, 1998) e *Globodera rostochiensis* (Buskov, Serra *et al.*, 2002).

## **2.2. Modo de ação dos isotiocianatos**

Na célula, o mecanismo de ação do isotiocianato inclui fenômenos como o de inibir o transporte de elétrons através da cadeia de transporte de elétrons, o da inativação de proteínas p66 e, ainda, ativação da cascata de sinais para indução da apoptose da célula (Figura 3). Estas vias são demonstradas em mamíferos, mas em procariontos foi constatada apenas a redução da produção de ATP, entretanto, as vias de apoptose em procariontos são semelhantes ao do eucariotos (Grassme, Jendrosseck *et al.*, 2001).

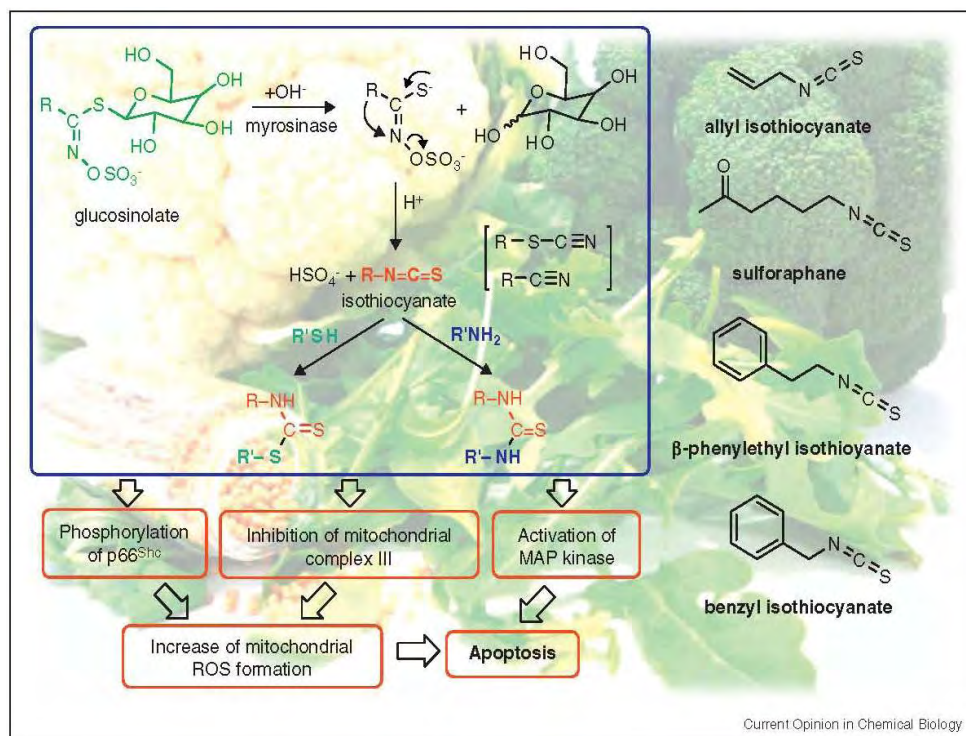


Figura 3 – Mecanismos de ação do isotiocianato na célula. Fonte Jacob, Jamier *et al.* (2011).

Conhecem-se vários eventos desencadeados pelos isotiocianatos (ITC-alil, ITC-benzil, ITC-β fenilil e sulforafano) ao interagir com os diferentes sítios dentro da célula, o que vai definir algumas das rotas do seu mecanismo de ação (Figura 5). Os isotiocianatos em contato com as células dos microorganismos penetram passivamente para seu interior (Zhang, 2004). Os isotiocianatos têm afinidades por regiões thiol, amino e hidroxil das proteínas (Figura 4). A ligação do composto nestas regiões pode ocorrer por inativação ou ativação, dependendo da proteína (Thornalley, 2002). Na membrana plasmática encontram-se proteínas receptoras com dois ligantes associados, o FADD e caspase-8, que com a tiocarbamoilação das proteínas receptoras são liberados no citosol. Dependendo da concentração destes ligantes eles serão sinalizadores para a ativação de genes de defesa ou morte celular (Satyan, Swamy *et al.*, 2006). O terceiro passo após a entrada do isotiocianato na célula

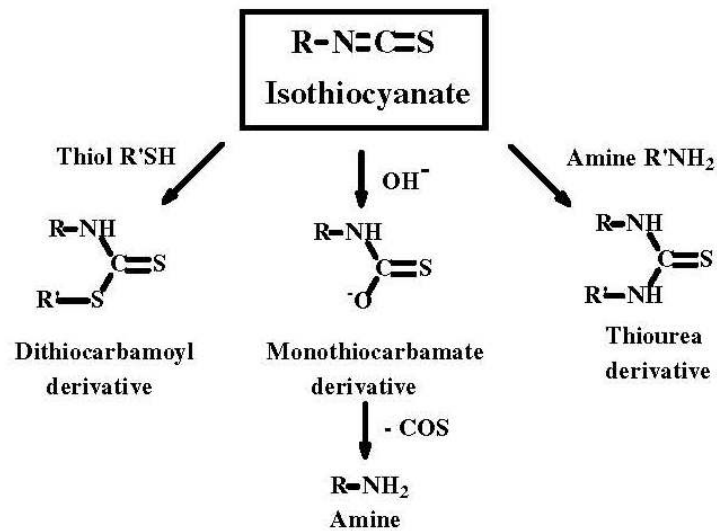


Figura 4 – Reações do isotiocianato com as regiões das proteínas. Fonte Thornalley (2002).

é a ativação de duas vias para apoptose. A primeira é a ativação da cascata de sinal pelas proteínas MEKK1/SEK1/JNK1. A segunda via é a da ativação da caspase-8 pela proteína receptora da membrana tiocarbamoizada (Thornalley, 2002). A proteína caspase-8 ativa a proteína caspase-3. A proteína caspase-9 sofre clivagem citosólica, produzindo a proteína BID, p15, p13 e p11. Ativação da via JNKs (c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal protein Kinases), estimulando a expressão do ligante Fas, potencializa a expressão de genes ligados a apoptose. Na última etapa, a proteína p15 se liga a Bcl-x<sub>L</sub> e a Bcl-2 e ocorre a fosforilação pela JNK1 e caspase-3, inativando o complexo III da mitocondria. O complexo III faz parte da cadeia transportadora de elétrons e com a interrupção ocorre a formação de espécies reativas de oxigênio, e redução de 50% da síntese de ATP pela célula (Miyoshi, Watanabe *et al.*, 2008). As espécies reativas de oxigênio oxidam lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos e provocam o extravasamento do citosol e a morte da célula.

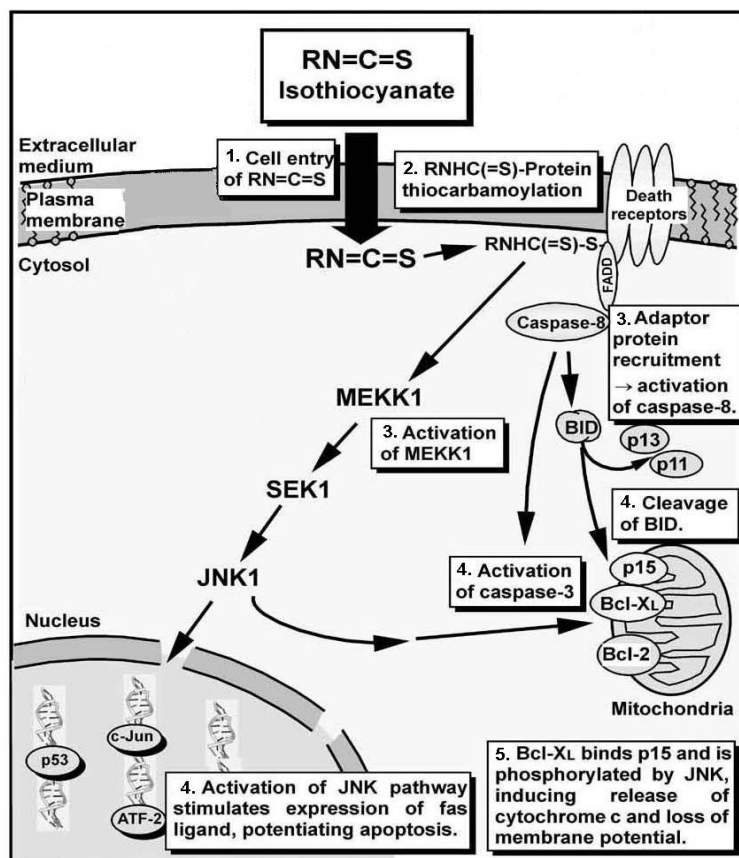


Figura 5 – Rotas do mecanismo de ação do isotiocianato na célula. 1- Entrada do isotiocianato na célula por difusão passiva. 2- Tiocarbamoilação de proteínas receptoras na membrana plasmática. 3- Ativação da cascata de sinal (MEKK1 e caspase-8) pela proteína receptora da membrana tiocarbamoilada. 4- Ativação da caspase-3 pela caspase-8 e clivagem citosólica em proteína BID. Ativação da via JNK (c-Jun N-terminal kinase), estimulando a expressão do ligante Fas, potencializando a apoptose. 5- Fosforilação das proteínas p15 e Bcl-X<sub>L</sub> pela JNK1. Fonte Thornalley (2002).

Outro mecanismo de ação do isotiocianato é a inativação da proteína p66. Essa proteína é sinalizadora para expressão de genes de detoxificação de espécies reativas de oxigênio (Pellegrini, Pacini *et al.*, 2005). Com a inativação dessa proteína os genes que produzem catalases e peroxidases não serão expressos e o micro-organismo não será capaz de evitar o efeito das espécies reativas de oxigênio produzidas pela mitocôndria ou pela apoptose.

O mecanismo de defesa da célula contra o isotiocianato envolve a glutatona S-transferase (Vanhaelen, Haubruge *et al.*, 2001). Esta enzima está localizada no citosol da célula e quando da penetração do isotiocianato ocorre uma ligação entre a glutatona e o isotiocianato, inativando o composto, e

transporte para o exterior da célula pela proteína trans-membrana ATPases/MRP (Figura 6). A enzima glutathiona é composta pelos aminoácidos: ácido glutâmico (Glu), cisteína (Cys) e glicina (Gly) e a cisteína tem radical SH (tiol) onde ocorrerá a ligação com o isotiocianato (Figura 7).

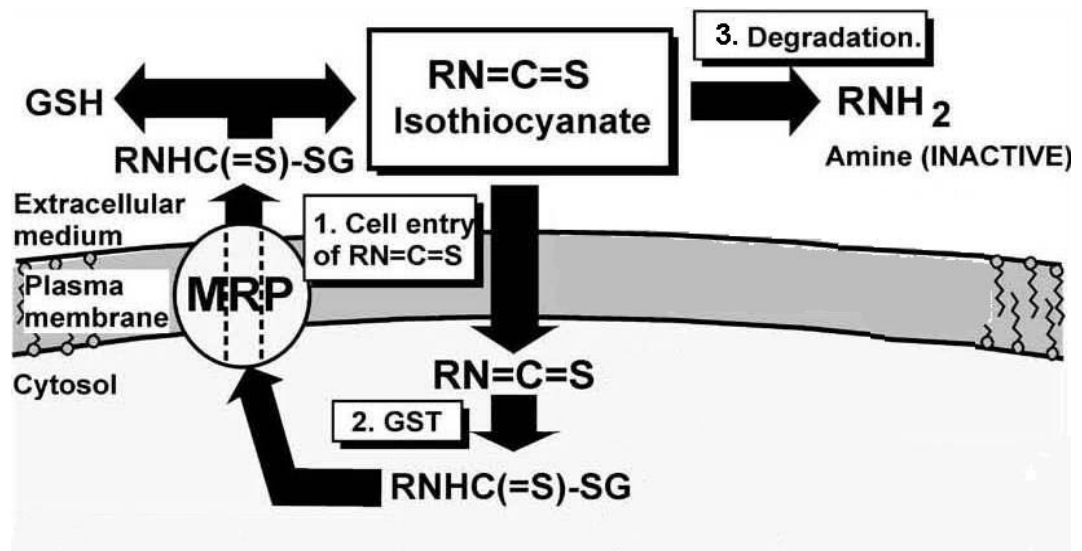


Figura 6 – Mecanismo de destoxificação do isotiocianato, pela glutathiona S-transferase. Fonte Keum, Jeong *et al.* (2004)

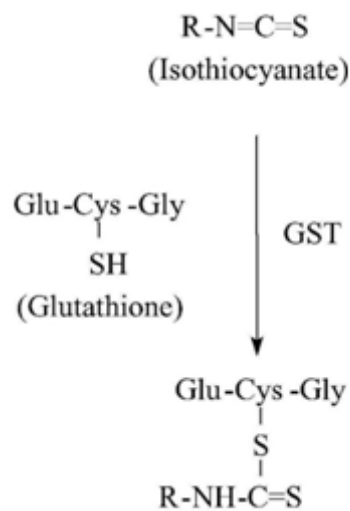


Figura 7 – Esquema da reação do isotiocianato com o radical tiol da glutathiona S-transferase. Fonte Keum, Jeong *et al.* (2004).

Após o transporte ativo para o exterior da célula a ligação entre a glutathiona S-transferase e o isotiocianato é quebrada. No meio extracelular o composto é degradado ou dissipado por meio da volatilização.

A glutathiona S-transferase é produzida continuamente na célula, sendo responsável pela destoxificação de outros xenobióticos. Outras formas desta enzima são responsáveis pela manutenção da concentração de espécies reativas de oxigênio (Oakley, 2005). Embora esta enzima seja encontrada principalmente em animais, foram encontrados genes homólogos a ela em fungos e bactérias resistentes ao isotiocianato (Wiktelius e Stenberg, 2007; Rahmanpour, Backhouse *et al.*, 2009; Hasegawa, Miwa *et al.*, 2010; Fan, Crooks *et al.*, 2011). A exposição ao isotiocianato do patógeno *Alternaria brassicicola* contendo o gene AbGst1 resultou na expressão deste gene e consequente produção de uma enzima homóloga à glutathiona s-transferase (Sellam, Poupard *et al.*, 2006). A expressão da glutathiona S-transferase nas células é aumentada quando a mesma está em contato com o isotiocianato, ocorrendo o pico da concentração após cinco horas de exposição da célula ao composto (Hasegawa, Miwa *et al.*, 2010).

### **2.3. O solo**

O solo é um corpo natural, dinâmico e vivo que desempenha diversas funções-chaves nos ecossistemas terrestres (Jordan, Kremer *et al.*, 1995). Os referidos autores definiram “qualidade do solo” como a capacidade do mesmo funcionar dentro de um ecossistema de maneira a sustentar a produtividade biológica, manter a qualidade ambiental e promover a saúde vegetal e animal.

As avaliações dos atributos biológicos, tais como a atividade das enzimas do solo, a taxa de respiração, a diversidade e a biomassa microbianas se ajustam a critérios de indicadores de qualidade do solo, como sensibilidade, acurácia, fácil mensuração e indicadores universais no tempo e espaço. Isto se deve, principalmente, à sua capacidade de responder rapidamente à influência conjunta de todos os fatores presentes no solo (Kennedy e Papendick, 1995).

## **2.4. Indicadores da qualidade do solo**

A qualidade preconiza o entendimento do solo como um todo, e enfatiza a necessidade de avaliações químicas, físicas e biológicas para que sejam possíveis inferências sobre sua sustentabilidade. Até recentemente, a maioria das avaliações tratava apenas de propriedades químicas, como conteúdo total de carbono orgânico e suas frações, conteúdo de nitrogênio, ou então de atributos físicos, como agregação (Hill, Mitkowski *et al.*, 2000) e parâmetros relacionados à dinâmica da água no solo (Dexter, 2004).

## **2.5. Indicadores Microbiológicos do solo**

### **2.5.1. Biomassa microbiana do solo**

Muitas são as metodologias empregadas para se determinar a biomassa microbiana, sendo as principais a de fumigação-incubação (Jenkinson e Ladd, 1981) e fumigação-extração (Vance, Brookes *et al.*, 1987). Elas se baseiam na fumigação do solo com clorofórmio para matar todas as populações de micro-organismos. A diferença entre elas é a de que na fumigação-incubação o carbono é determinado em função do CO<sub>2</sub> liberado durante um período de incubação do solo, sendo resultado da respiração decorrente do crescimento de organismos que usam os organismos mortos na fumigação como substrato para o crescimento. Na incubação-extração o carbono é determinado após a extração com K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, oxidação e digestão química, seguida de titulação.

Segundo Smith e Paul (1990), a biomassa é um importante reservatório de nutrientes no solo e é reciclada com rapidez. Em determinadas situações, como em regiões de clima tropical, assume um papel importante como fonte de nutrientes facilmente disponíveis para os micro-organismos do solo e plantas, uma vez que corresponde a aproximadamente 4% da matéria orgânica total do solo (Feigl, Sparling *et al.*, 1995), enquanto os valores em solos de clima temperado situam-se ao redor de 2% da matéria orgânica. Embora represente uma pequena parte do carbono orgânico do solo, a BM é um indicador sensível de mudanças nesse ecossistema, principalmente por causas antropogênicas.

### **2.5.2. Respiração microbiana do solo**

A respiração microbiana é uma das variáveis mais antigas para quantificar a atividade de oxidação da matéria orgânica do solo por organismos aeróbios. Ela pode ser mensurada no campo, sob condições naturais, ou em laboratório. A determinação da respiração microbiana no laboratório pode ser feita por meio da medida do O<sub>2</sub> consumido ou do CO<sub>2</sub> liberado do solo. A mais utilizada é pela determinação do CO<sub>2</sub> liberado por método titulométricos (quando capturado por NaOH ou KOH), ou ainda por cromatografia gasosa, espectroscopia de infravermelho ou pelo uso de <sup>14</sup>C.

A respiração microbiana reflete a atividade dos micro-organismos do solo que promovem a decomposição de resíduos orgânicos e, por isso é utilizada para indicar a qualidade do solo. Contudo, a interpretação de seus valores deve ser realizada com cautela, pois uma alta taxa de respiração pode ser uma característica desejável, considerando-se que ela é um sinal de rápida decomposição de resíduos orgânicos, tornando nutrientes disponíveis para as plantas. Entretanto, a decomposição da matéria orgânica estável é desfavorável para muitos processos químicos e físicos do solo como, a agregação, a capacidade de troca de cátions e outros associados a estes, como a capacidade de retenção de água (Tótola e Chaer, 2002).

### **2.5.3. Enzimas do solo**

As enzimas têm participação essencial nos processos relacionados à qualidade do solo, pois é por meio delas que os micro-organismos do solo degradam moléculas orgânicas complexas, tornando-as moléculas simples acessíveis aos micro-organismos, como fonte de energia e nutrientes. As enzimas estão presentes em baixas concentrações no solo e a quantificação destas é feita de maneira indireta, pela determinação de suas atividades, e não pela sua quantidade. Geralmente, a atividade é determinada em reação com uso de substrato específico a enzima a ser avaliada, em condições padronizadas de pH e temperatura (Caldwell, 2005).

A escolha das enzimas a serem analisadas para se avaliar a qualidade do solo é feita com base em sua sensibilidade ao processo de manejo do solo,

à decomposição da matéria orgânica e operacionalidade da análise. As enzimas mais comumente analisadas são as hidrolases ligadas aos ciclos dos principais elementos do solo como C, N, P e S.

As glicosidases podem ser encontradas em plantas, animais e micro-organismos e catalisam reações de hidrólise de maltose e celobiose, cujos produtos são importantes fontes de energia para os micro-organismos do solo (Caldwell, 2005).

As fosfatases são de fundamental importância na mineralização de compostos orgânicos fosfatados, conseqüentemente, na ciclagem de fósforo no ambiente. Elas estão amplamente distribuídas no solo e têm sido muito estudadas porque catalisam a hidrólise de fósforo orgânico a fósforo inorgânico, disponibilizando-o para as plantas. De acordo com seu pH ótimo de ação podem ser classificadas como ácidas (pH 6,5) ou alcalinas (pH 11) (Caldwell, 2005).

A atividade enzimática pode ser influenciada por propriedades do solo como umidade e conteúdo de carbono orgânico (Jordan, Kremer *et al.*, 1995; Bergstrom, Monreal *et al.*, 1998), pela dinâmica da água e distribuição da biomassa radicular no solo (Amador, Glucksman *et al.*, 1997), e por práticas de manejo (Caldwell, 2005).

#### **2.5.4. Diversidade microbiana**

A diversidade microbiana do solo começou a ser revelada, de fato, com o uso de métodos de biologia molecular a partir do uso da análise da taxa de reassociação do DNA em amostras de solo (Torsvik, Goksoyr *et al.*, 1990). Esse método propiciou a descoberta de uma diversidade muito maior, cerca de 4.000 genomas diferentes, do que a avaliada com as tradicionais técnicas de cultivo. Também a técnica da eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), inicialmente empregada na medicina (Nakatsu, 2007), possibilitou a análise de populações microbianas complexas em estudos de ecologia microbiana (Muyzer, Dewaal *et al.*, 1993).

A quantidade de células procarióticas é estimada em 4 a 6 x 10<sup>30</sup> e a biomassa em 350 a 550 x 10<sup>9</sup> ton de C, 85 a 130 x 10<sup>9</sup> ton de N e 9 a 14 x 10<sup>9</sup>

ton de P no planeta terra (Whitman, Coleman *et al.*, 1998). O teor de C nos procariotos é equivalente a 60 a 100% do carbono total estimado para os vegetais. As quantidades de N e P superam as dos demais organismos e constituem assim os maiores reservatórios desses elementos em organismos vivos. Os referidos autores mostraram que os principais habitats dos procariotos são as águas dos oceanos ( $1,2 \times 10^{29}$  células), o solo ( $2,6 \times 10^{29}$  células), a subsuperfície marinha abaixo de 10 cm ( $3,5 \times 10^{30}$  células), e a subsuperfície terrestre, abaixo de 8 metros de profundidade ( $0,25$  a  $2,5 \times 10^{30}$  células), ou seja, o principal habitat dos procariotos é a subsuperfície. Estudos anteriores já sugeriam que a biomassa da subsuperfície é suportada pela matéria orgânica proveniente da superfície (Wellsbury, Goodman *et al.*, 1997), os processos litoautotróficos complementam o aporte de energia nesses ecossistemas. Contudo, o solo é o maior reservatório de carbono orgânico do planeta e sua microbiota essencial para transformar a matéria orgânica e liberar nutrientes para as cadeias tróficas (Sylvia, Fuhrmann *et al.*, 2005).

A técnica de DGGE em 1999 possibilitou determinar a estrutura das comunidades bacterianas em 16 tipos de solo em diferentes regiões, mostrando que solos com características similares congregam comunidades bacterianas também similares, uma indicação de que o tipo de solo é decisivo na organização das comunidades microbianas (Gelsomino, Keijzer-Wolters *et al.*, 1999).

## **2.6. Alterações na comunidade microbiana no solo**

Comumente o solo apresenta alta diversidade microbiana, mas, alterações antrópicas como o uso de pesticidas e outros produtos causam distúrbios negativos nesta comunidade (Ibekwe, 2004). O uso de pesticidas para o controle de fitopatógenos não afeta somente os patógenos, que são os micro-organismos alvo. O brometo de metila quando ainda era usado para controle de nematóides, fungos e bactérias reduzia a abundância de microrganismos no solo (Klose, Acosta-Martinez *et al.*, 2006). Já se sabe que populações de fungos e bactérias Gram negativas são as mais afetadas

(Ibekwe, Papiernik *et al.*, 2001; Hoshino e Matsumoto, 2007; Yamamoto, Ultra *et al.*, 2008).

A aplicação de metamidofós na dose de 23,8 mg Kg<sup>-1</sup> de solo causa redução na biomassa microbiana correspondente a 50% da originalmente existente (Wang, Liu *et al.*, 2008). Essa redução ocorreu principalmente na comunidade de fungos, pois as populações de bactérias não foram afetadas. Apesar desta alteração no perfil da comunidade microbiana, a respiração não foi afetada, entretanto, a riqueza e a diversidade do solo sofreram com estas alterações.

Essas alterações no perfil da comunidade microbiana do solo são dependentes do tipo de produto fumigante aplicado e da textura do solo. Assim, autores registram incremento na biomassa microbiana de 21% com o uso de brometo de metila + cloropicrina e de 35% quando do uso de brometo de propargil, e ainda ausência de alteração na biomassa com o uso de 1,3-diclopropano + cloropicrina (Klose e Ajwa, 2004). Estes tratamentos foram realizados em solos argilosos e avaliados após uma semana da aplicação. Em solos de textura média, a aplicação de qualquer dos produtos resultou na redução de 30% da biomassa microbiana (Klose e Ajwa, 2004; Stromberger, Klose *et al.*, 2005), e volta à condição natural do solo em 30 semanas após a aplicação dos produtos (Stromberger, Klose *et al.*, 2005).

Em solos tratados com brometo de metila + cloropicrina, brometo de propargil, 1,3-diclopropano + cloropicrina e iodometano, houve redução de 30% na taxa de respiração, independente da textura dos mesmos. Estes solos restabeleceram a taxa de respiração normal após 15 semanas de aplicação (Klose e Ajwa, 2004; Stromberger, Klose *et al.*, 2005). Já com o produto metam sódio, a redução foi de 98% após a aplicação (Macalady, Fuller *et al.*, 1998).

A utilização de cloropicrina diminuiu a população de bactérias Gram negativas após 8 dias da aplicação (Yamamoto, Ultra *et al.*, 2008). Aplicação de metam sódio ao solo gerou aumento no perfil de ácido graxos de bactérias Gram positivas e actinomicetes e redução na população bactérias Gram negativas (Macalady, Fuller *et al.*, 1998). A aplicação de metamidofós na dose de 23,8 mg kg<sup>-1</sup> de solo causou redução de 80% na população de fungos

cultiváveis e não alterou o número de colônias bacterianas, porém o índice de Shannon foi reduzido (Wang, Liu et al. (2008).

Enzimas secretadas pelos micro-organismos são importantes para a ciclagem de nutrientes e outras funções, a exemplo de desidrogenases. A aplicação de brometo de metila afeta a atividade desta classe de enzimas usadas como indicador da atividade metabólica de micro-organismos com redução de 70% após a aplicação de brometo de metila (Ibekwe, 2004). Esta atividade de enzimas pode ser restabelecida até a trigésima semana após aplicação do fumigante, e também a respiração e biomassa microbiana (Stromberger, Klose et al., 2005).

Outros fumigantes como cloropicrina, 1,3-dicloropropano, iodometano e metil-isitiocianato, causam redução na atividade das desidrogenases, fosfatase ácida, arilsulfatase e  $\beta$ -glicosidase, porém, comparativamente a atividade destas enzimas foram maiores na primeira semana após a aplicação do brometo de metila (Klose e Ajwa, 2004; Klose, Acosta-Martinez et al., 2006). No caso do uso de substâncias originadas de plantas para o controle de fitopatógenos, assume-se que elas também provoquem alterações na atividade de enzimas presentes no solo, contudo, estas interferências são menores quando comparadas com aquelas de produtos fumigantes (Gopal, Gupta et al., 2007; Spyrou, Karpouzas et al., 2009).

Algumas informações sobre alterações na comunidade microbiana proporcionada pela incorporação de plantas de *Brassica* spp. ao solo já são conhecidas. *Rhizoctonia solani*, um patógeno de solo tem a sua população reduzida pela ação dos isotiocianatos de brássicas e pelo incremento de micro-organismos antagonistas presentes no solo (Cohen, M. F., Yamasaki, H. et al., 2005). Antagonistas residentes naturalmente no solo, como *Streptomyces* spp. e *Pseudomonas* spp., apresentaram incrementos em sua população após a incorporação de *Brassica napus* (Cohen, M. F., Yamasaki, H. et al., 2005; Brown e Morra, 2009).

A diversidade de bactérias e fungos do solo é menos afetada quando o solo é tratado com produtos naturais oriundos de *Azadirachta indica*, *Melia azedarach* e *Quillaja saponaria*, em comparação com produtos sintéticos (Gopal, Gupta et al., 2007; Spyrou, Karpouzas et al., 2009).

O retardamento do processo de desnitrificação, em razão do aumento de micro-organismos nitrificantes, aumenta a disponibilidade de nitrato para a planta e reduz a perda de nitrogênio por volatilização para a atmosfera (AmLinger, Gotz *et al.*, 2003; Brown e Morra, 2009). O sinergismo dos isotiocianatos 2-propenyl-ITC e dimethyl-sulphide Também retardam a ocorrência do processo de desnitrificação (Bending e Lincoln, 2000), em virtude da capacidade desses ITC's se ligarem às proteínas, alterando suas estruturas e funcionalidades.

### 3. Referencias bibliográficas

AGUIAR, N. D. C. **Tecnologia de uso da torta e do óleo essencial de mostarda no controle de *Meloidogyne exigua***. 2008. 65 (Mestrado em Fitopatologia). Fitopatologia, Dissertação de Mestrado em Fitopatologia. UFV/Viçosa

AKHTAR, M.; ALAM, M. M. Utilization of Waste Materials in Nematode Control - a Review. **Bioresource Technology**, v. 45, n. 1, p. 1-7, 1993.

ALEF, K. Soil respiration. In: ALEF, K. e NANNIPIERI, P. (Ed.). **Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry**. London: Academic Paris, 1995. p.214-219.

AMADOR, J. A. et al. Spatial distribution of soil phosphatase activity within a riparian forest. **Soil Science**, v. 162, n. 11, p. 808-825,1997.

AMLINGER, F. et al. Nitrogen in biowaste and yard waste compost: dynamics of mobilisation and availability - a review. **European Journal of Soil Biology**, v. 39, n. 3, p. 107-116, 2003.

BENDING, G. D.; LINCOLN, S. D. Inhibition of soil nitrifying bacteria communities and their activities by glucosinolate hydrolysis products. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 32, n. 8-9, p. 1261-1269, 2000.

BERGSTROM, D. W.; MONREAL, C. M.; KING, D. J. Sensitivity of Soil Enzyme Activities to Conservation Practices. **Soil Sci Soc Am J**, v. 62, n. 5, p. 1286-1295, 1998.

BONETI, J. I. S. et al. Influência do parasitismo de *Meloidogyne exigua* sobre absorção de micronutrientes (Zn, Cu, Fe, Mn e B) e sobre o vigor de mudas de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 7, p. 197-207, 1982.

BRIDGE, J. Nematode management in sustainable and subsistence agriculture. **Annual Review of Phytopathology**, v. 34, p. 201-225, 1996.

BROWN, P. D.; MORRA, M. J. Hydrolysis products of glucosinolates in *Brassica napus* tissues as inhibitors of seed germination. **Plant and Soil**, v. 181, n. 2, p. 307-316, 1996.

\_\_\_\_\_. Control of soil-borne plant pests using glucosinolate-containing plants. **Advances in Agronomy**, v. 61, p. 167-231, 1997.

\_\_\_\_\_. Brassicaceae Tissues as Inhibitors of Nitrification in Soil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 17, p. 7706-7711, 2009.

BUSKOV, S. et al. Effects of intact glucosinolates and products produced from glucosinolates in myrosinase-catalyzed hydrolysis on the potato cyst nematode (*Globodera rostochiensis* cv. Woll). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 4, p. 690-695, 2002.

CALDWELL, B. A. Enzyme activities as a component of soil biodiversity: A review. **Pedobiologia**, v. 49, n. 6, p. 637-644, 2005.

CAMPOS, S. C. et al. Eficácia do extrato de mostarda (*Brassica alba* L.) no controle de *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) em grãos de milho. I Simpósio de Entomologia da UFV, 2004. Viçosa. p.256-260.

CHARRON, C. S.; SAMS, C. E.; CANADAY, C. H. Impact of glucosinolate content in broccoli (*Brassica oleracea* (Italica group)) on growth of *Pseudomonas marginalis*, a causal agent of bacterial soft rot. **Plant Disease**, v. 86, p. 629-632, 2002.

CHEN, Y. R. et al. Phenylethyl isothiocyanate induces apoptotic signaling via suppressing phosphatase activity against c-Jun N-terminal kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 42, p. 39334-39342, 2002.

CHUNG, W. C. et al. Effect of ground Brassica seed meal on control of Rhizoctonia damping-off of cabbage. **Canadian Journal of Plant Pathology- Revue Canadienne De Phytopathologie**, v. 24, n. 2, p. 211-218, 2002.

COHEN, M. F.; YAMASAKI, H.; MAZZOLA, M. *Brassica napus* seed meal soil amendment modifies microbial community structure, nitric oxide production and incidence of Rhizoctonia root rot. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 37, n. 7, p. 1215-1227, 2005.

COHEN, M. F.; YAMASAKI, H.; MAZZOLA, M. *Brassica napus* seed meal soil amendment modifies microbial community structure, nitric oxide production and incidence of Rhizoctonia root rot. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 37, p. 1215-1227, 2005.

COSTA, R. R. et al. Toxicity of mustard essential oil to larvae and pupas of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). 9th International Working Conference on Stored Product Protection, 2006. Campinas. Proceedings of the 9th International Working Conference on Stored Product Protection. p.908-913.

DAYAN, F. E.; CANTRELL, C. L.; DUKE, S. O. Natural products in crop protection. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 12, p. 4022-4034, 2009.

DEXTER, A. R. Soil physical quality - Part I. Theory, effects of soil texture, density, and organic matter, and effects on root growth. **Geoderma**, v. 120, n. 3-4, p. 201-214, 2004.

DHINGRA, O. D. et al. Essential oil of mustard to control *Rhizoctonia solani* causing seedling damping off and seedling blight in nurser. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 6, p. 683-686, 2004.

DROBNICA, L. et al. Antifungal activity of isothiocyanates and related compounds .I. Naturally occurring isothiocyanates and their analogues. **Applied Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 701-8, 1967.

DUNIWAY, J. M. Status of chemical alternatives to methyl bromide for pre-plant fumigation of soil. **Phytopathology**, v. 92, p. 1337-1343, 2002.

ELLENBY, C. Control of the Potato-Root Eelworm, *Heterodera rostochiensis* Wollenweber, by Allyl Isothiocyanate, the Mustard Oil of *Brassica nigra* L. **Annals of Applied Biology**, v. 32, n. 3, p. 237-239, 1945.

FAN, J. et al. Pseudomonas sax Genes Overcome Aliphatic Isothiocyanate-Mediated Non-Host Resistance in Arabidopsis. **Science**, v. 331, n. 6021, p. 1185-1188, 2011.

FEIGL, B. J. et al. Soil microbial biomass in amazonian soils - evaluation of methods and estimates of pool sizes. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 27, n. 11, p. 1467-1472, 1995.

FERRAZ, S.; FREITAS, L. G. Use of Plants and Natural Products. In: CHEN, Z. X.; CHEN, S. Y., *et al* (Ed.). **Nematology: Advances and Perspectives. Nematode Management and Utilization**, v.2, 2004. p.931-977.

FRANCO-NAVARRO, F. et al. Application of organic amendments for the management of *Nacobbus aberrans* on tomato. **Nematropica**, v. 32, n. 2, p. 113-124, 2002.

GELSOMINO, A. et al. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 38, n. 1-2, p. 1-15, 1999.

GOPAL, M. et al. Impact of azadirachtin, an insecticidal allelochemical from neem on soil microflora, enzyme and respiratory activities. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 16, p. 3154-3158, 2007.

GOULART, R. R. **Biofumigação com *Brassica rapa* para o controle de *Meloidogyne exigua* em diferentes texturas e umidades do solo**. 2007. 52 (Mestrado em Fitopatologia). Fitopatologia, Dissertação de Mestrado em Fitopatologia. UFV/Viçosa

GRASSME, H.; JENDROSSEK, V.; GULBINS, E. Molecular mechanisms of bacteria induced apoptosis. **Apoptosis**, v. 6, n. 6, p. 441-445, 2001.

HASEGAWA, K. et al. Allyl Isothiocyanate that Induces GST and UGT Expression Confers Oxidative Stress Resistance on *C. elegans*, as Demonstrated by Nematode Biosensor. **Plos One**, v. 5, n. 2, p. -, 2010.

HILL, G. T. et al. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. **Applied Soil Ecology**, v. 15, n. 1, p. 25-36, 2000.

HOSHINO, Y. T.; MATSUMOTO, N. Changes in fungal community structure in bulk soil and spinach rhizosphere soil after chemical fumigation as revealed by 18S rDNA PCR-DGGE. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 53, n. 1, p. 40-55, 2007.

IBEKWE, A. M. Effects of fumigants on non-target organisms in soils. **Advances in Agronomy, Vol 83**, v. 83, p. 1-35, 2004.

IBEKWE, A. M. et al. Impact of fumigants on soil microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 3245-3257, 2001.

JACOB, C.; JAMIER, V.; BA, L. A. Redox active secondary metabolites. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, n. 1, p. 149-155, 2011.

JENKINSON, D. S.; LADD, J. N. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. In: PAUL, E. A. e LADD, J. N. (Ed.). **Soil Biochemistry**. New York: Marcel Dekker, v.5, 1981. p.415-471.

JORDAN, D. et al. Evaluation of Microbial Methods as Potential Indicators of Soil Quality in Historical Agricultural Fields. **Biology and Fertility of Soils**, v. 19, n. 4, p. 297-302, 1995.

KENNEDY, A. C.; PAPENDICK, R. I. Microbial Characteristics of Soil Quality. **Journal of Soil and Water Conservation**, v. 50, n. 3, p. 243-248, 1995.

KEUM, Y. S.; JEONG, W. S.; KONG, A. N. T. Chemoprevention by isothiocyanates and their underlying molecular signaling mechanisms. **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 555, n. 1-2, p. 191-202, 2004.

KIRKEGAARD, J. A.; SARWAR, M. Biofumigation potential of brassicas I. Variation in glucosinolate profiles of diverse field-grown brassicas. **Plant and Soil**, v. 201, p. 71–89, 1998.

KLOSE, S.; ACOSTA-MARTINEZ, V.; AJWA, H. A. Microbial community composition and enzyme activities in a sandy loam soil after fumigation with methyl bromide or alternative biocides. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 38, n. 6, p. 1243-1254, 2006.

KLOSE, S.; AJWA, H. A. Enzyme activities in agricultural soils fumigated with methyl bromide alternatives. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 36, n. 10, p. 1625-1635, 2004.

LIMA, A. O. **Uso da Mostarda (*Brassica rapa*) como biofumigante de solo no controle de *Meloidogyne incognita***. 2006. 55 (Mestrado em Fitopatologia). Fitopatologia, Dissertação de Mestrado em Fitopatologia. UFV/Viçosa

MACALADY, J. L.; FULLER, M. E.; SCOW, K. M. Effects of metam sodium fumigation on soil microbial activity and community structure. **Journal of Environmental Quality**, v. 27, n. 1, p. 54-63, 1998.

MAPA. **MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 19, DE 7 DE JULHO DE 2005.** Disponível em:<<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=12412>> Acesso 25 novembro de 2011. 2010.

MIYOSHI, N. et al. ATP depletion alters the mode of cell death induced by benzyl isothiocyanate. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease**, v. 1782, n. 10, p. 566-573, 2008.

MOJTAHEDI, H. et al. Suppression of Root-knot nematode populations with selected rapeseed cultivars as green manure. **Journal of Nematology**, v. 23, n. 2, p. 170-174, 1991.

MOJTAHEDI, H. et al. Managing *Meloidogyne chitwoodi* on Potato with Rapeseed as Green Manure. **Plant Disease**, v. 77, n. 1, p. 42-46, 1993.

MOREIRA, F. M. D. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo.** Lavras: Ufla, 2002. 626

MUYZER, G.; DEWAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of Complex Microbial-Populations by Denaturing Gradient Gel-Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes-Coding for 16s Ribosomal-Rna. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.

NAKATSU, C. H. Soil microbial community analysis using denaturing gradient gel electrophoresis. **Soil Science Society of America Journal**, v. 71, n. 2, p. 562-571, 2007.

OAKLEY, A. J. Glutathione transferases: new functions. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 15, n. 6, p. 716-723, 2005.

OLIVEIRA, R. D. L. et al. Glucosinolate content and nematicidal activity of Brazilian wild mustard tissues against *Meloidogyne incognita* in tomato. **Plant and Soil**, v. 341, n. 1-2, p. 155-164, 2011.

PELLEGRINI, M.; PACINI, S.; BALDARI, C. T. p66SHC: The apoptotic side of Shc proteins. **Apoptosis**, v. 10, n. 1, p. 13-18, 2005.

POTTER, M. J.; DAVIES, K.; RATHJEN, A. J. Suppressive impact of glucosinolates in Brassica vegetative tissues on root lesion nematode *Pratylenchus neglectus*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 24, n. 1, p. 67-80, 1998.

RAHMANPOUR, S.; BACKHOUSE, D.; NONHEBEL, H. M. Induced tolerance of *Sclerotinia sclerotiorum* to isothiocyanates and toxic volatiles from Brassica species. **Plant Pathology**, v. 58, n. 3, p. 479-486, 2009.

SATYAN, K. S. et al. Phenethyl isothiocyanate (PEITC) inhibits growth of ovarian cancer cells by inducing apoptosis: Role of caspase and MAPK activation. **Gynecologic Oncology**, v. 103, n. 1, p. 261-270, 2006.

SCHURT, D. A. **Potencial do isotilcianato de alilo no controle de *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum***. 2006. 57 (Mestrado em Fitopatologia). Fitopatologia, Dissertação de Mestrado em Fitopatologia. UFV/Viçosa

SELLAM, A.; POUPARD, P.; SIMONEAU, P. Molecular cloning of AbGst1 encoding a glutathione transferase differentially expressed during exposure of *Alternaria brassicicola* to isothiocyanates. **Fems Microbiology Letters**, v. 258, n. 2, p. 241-249, 2006.

SMITH, J. L.; PAUL, E. A. Significance of soil microbial biomass estimates in soil. In: BOLLAG, J. M. e STOTZKY, G. (Ed.). **Soil Biochemistry**. New York: Dekker, v.6, 1990. p.357-396.

SMOLINSKA, U. et al. Toxicity of Glucosinolate Degradation Products from *Brassica napus* Seed Meal Toward *Aphanomyces euteiches* f. sp. pisi. **Phytopathology**, v. 87, p. 77-82, 1997.

SMOLINSKA, U. et al. Isothiocyanates produced by Brassicaceae species as inhibitors of *Fusarium oxysporum*. **Plant Disease**, v. 87, n. 4, p. 407-412, 2003.

SPYROU, I. M.; KARPOUZAS, D. G.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U. Do Botanical Pesticides Alter the Structure of the Soil Microbial Community? **Microbial Ecology**, v. 58, n. 4, p. 715-727, 2009.

STROMBERGER, M. E. et al. Microbial populations and enzyme activities in soils fumigated with methyl bromide alternatives. **Soil Science Society of America Journal**, v. 69, n. 6, p. 1987-1999, 2005.

SYLVIA, D. M.; FUHRMANN, J. J.; HARTEL, P. G. **Principles and applications of soil microbiology**. 2. New Jersey: Pearson Prentice Hall™, 2005. 640

THORNALLEY, P. J. Isothiocyanates: mechanism of cancer chemopreventive action. **Anti-Cancer Drugs**, v. 13, n. 4, p. 331-338, 2002.

TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F. L. High Diversity in DNA of Soil Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 782-787, 1990.

TÓTOLA, M. R.; CHAER, G. M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. In: ALVARES, V. H.;SCHAEFER, C. E. G. R., *et al* (Ed.). **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v.2, 2002. p.195-276.

TRONCONI, N. M. et al. Influência da temperatura na patogenicidade e reprodução de *Meloidogyne exigua* em mudas de cafeeiro. **Nematologia Brasileira**, v. 10, p. 69-83, 1986.

UNEP. Montreal Protocol on Substances that deplete the ozone layer : United Nations Environment Programme. Methyl bromide technical options committee. **Assessment of Alternative to Methyl Bromide**, 1998.

VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. An Extraction Method for Measuring Soil Microbial Biomass-C. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 19, n. 6, p. 703-707, 1987.

VANHAELEN, N. et al. Hoverfly glutathione S-transferases and effect of Brassicaceae secondary metabolites. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 71, n. 3, p. 170-177, 2001.

VIG, A. P. et al. Bio-protective effects of glucosinolates - A review. **Lwt-Food Science and Technology**, v. 42, n. 10, p. 1561-1572, 2009.

WANG, M. C. et al. Impacts of methamidophos on the biochemical, catabolic, and genetic characteristics of soil microbial communities. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, n. 3, p. 778-788, 2008.

WELLSBURY, P. et al. Deep marine biosphere fuelled by increasing organic matter availability during burial and heating. **Nature**, v. 388, n. 6642, p. 573-576, 1997.

WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J. Prokaryotes: The unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 12, p. 6578-6583, 1998.

WIKTELIUS, E.; STENBERG, G. Novel class of glutathione transferases from cyanobacteria exhibit high catalytic activities towards naturally occurring isothiocyanates. **Biochemical Journal**, v. 406, p. 115-123, 2007.

YAMAMOTO, T. et al. Effects of methyl bromide fumigation, chloropicrin fumigation and steam sterilization on soil nitrogen dynamics and microbial properties in a pot culture experiment. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 54, n. 6, p. 886-894, 2008.

ZASADA, I. A.; FERRIS, H. Sensitivity of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans* to isothiocyanates in laboratory assays. **Phytopathology**, v. 93, n. 6, p. 747-750, 2003.

ZHANG, Y. S. Cancer-preventive isothiocyanates: measurement of human exposure and mechanism of action. **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 555, n. 1-2, p. 173-190, 2004.

## Capítulo 1 - Alteração da comunidade microbiana em três texturas diferentes pela aplicação do isotiocianato de alila.

### 1. Introdução

O solo é um corpo natural, dinâmico e vivo que desempenha diversas funções-chaves nos ecossistemas terrestres (Jordan, Kremer *et al.*, 1995). É, portanto, um dos componentes essenciais para a vida e a saúde da humanidade e de toda a vida no planeta. A diversidade de microrganismos no solo é influenciada principalmente pela quantidade de água e nutrientes presentes. Em solos com baixo teor de argila (solos arenosos), a capacidade de retenção de água é inferior à dos solos ricos em argila. Essa diferença na capacidade de retenção de água influencia a comunidade microbiana do solo, e solos com maior teor de argila apresentam maior diversidade de microrganismos (Reeve, Schadt *et al.*, 2010; Chau, Bagtzoglou *et al.*, 2011). Não existem no solo apenas microrganismos benéficos, pois são encontrados também patógenos de plantas, os quais interferem negativamente na agricultura. Para minimizar ou evitar os danos e as perdas que os fitopatógenos causam é comum recorrer-se ao seu controle por meio de várias medidas de manejo, inclusive o uso de agrotóxicos. Esses produtos controlam o patógeno, mas também interferem na comunidade microbiana benéfica (Klose e Ajwa, 2004; Collins, Alva *et al.*, 2006; Niemi, Heiskanen *et al.*, 2009; Munoz-Leoz, Ruiz-Romera *et al.*, 2011). Dentre os defensivos mais usados e eficientes para o controle de patógenos em sementeiras, viveiros e em cultivos protegidos estão os fumigantes como o Metam sódico, Isotiocianato de metila e Brometo de metila (Duniway, 2002). Esses compostos são em sua maioria muito tóxicos para animais e microrganismos. O brometo de metila, um dos fumigantes mais usados, teve a sua comercialização proibida em quase todo o mundo (Sinha, Agnihotri *et al.*, 1979; Unep, 1998; Omirou, Rousidou *et al.*, 2011), o que está ocasionando a busca de compostos alternativos.

Diversas plantas são conhecidas por apresentarem substâncias com efeito nematicida e, ou, nematostático (Ferraz e Freitas, 2004). Dentre essas, merecem destaque as plantas da família Brassicaceae, em razão das

potencialidades de seu uso no controle de fungos, bactérias e nematóides habitantes de solo (Drobnica, Zemanova *et al.*, 1967; Brown e Morra, 1997; Chen, Han *et al.*, 2002; Dayan, Cantrell *et al.*, 2009; Vig, Rampal *et al.*, 2009). A incorporação de partes de brássicas ao substrato de cultivo visando ao controle de fitonematóides não é assunto recente (Ellenby, 1945) e pesquisas sobre seus princípios ativos ainda continuam a atrair a atenção de estudiosos (Mojtahedi, Santo *et al.*, 1993; Potter, Davies *et al.*, 1998; Potter, Vanstone *et al.*, 2000; Oliveira, Dhingra *et al.*, 2011). Entretanto, estudos sobre o efeito das brassicáceas sobre a comunidade microbiana do solo apenas começaram, e partes ou plantas inteiras de brássicas incorporadas ao solo são o alvo de tais estudos (Cohen, M. F., Yamasaki, H. *et al.*, 2005; Henderson, Riga *et al.*, 2009a; Mazzola e Zhao, 2010; Omirou, Rousidou *et al.*, 2011; Wang, Hu *et al.*, 2012). A ação do isotiocianato de alila (ITCA), que é o principal produto do metabolismo secundário das brássicas, não foi ainda explorada. Subprodutos da mostarda (*Brassica juncea*) e o ITCA são pesquisados no laboratório de Nematologia/DFP/UFV pela sua atividade nematicida (Lima, 2006; Goulart, 2007; Aguiar, 2008; Castro, 2010) e acredita-se que a resiliência do solo tratado com ITCA pode ser conseguida em curto período após a sua aplicação.

Nesse trabalho, buscou-se verificar a influência do Isotiocianato de alila na recomposição da comunidade microbiana em solos com diferentes texturas.

## **2. Material e métodos**

Quinhentos gramas de solo de três texturas (tabela 1) foram tratados com ITCA nas doses de 0 e 100  $\mu\text{L.Kg}^{-1}$  de solo. Essas amostras foram colocadas em sacos plásticos vedados, em temperatura controlada de 26 °C, por cinco dias. Então, os sacos foram abertos e divididos em cinco subamostras de 100 gramas, para a realização das análises microbiológicas. O experimento foi montado em blocos casualizados, com três repetições.

**Tabela 1** – Análise física e classe textural dos solos utilizados no estudo da ação do Isotiocianato de alila (ITCA) na comunidade microbiana.

Classe Textural	Areia Grossa	Areia Fina	Silte	Argila
	dag/Kg			
Franco-Arenosa*	33	43	6	18
Franco-Argila-Arenosa**	35	33	3	29
Argila***	25	14	14	47

\* Coletado no município de Monte Alto/SP (S 21°19' 14", H 48°26' 74");

\*\* Coletado no município de Monte Alto/SP (S 21°19' 73", H 48°27' 21");

\*\*\* Coletado no município de Viçosa/MG (S 20°47' 39", H 42°50' 01").

**Tabela 2** – Análise química dos solos utilizados no estudo da ação do Isotiocianato de alila (ITCA) na comunidade microbiana.

Textura Solo	pH	P	K	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Al <sup>3+</sup>	H+Al	P-rem
Franco-Arenosa	5,6	8,4	45	0,83	0,38	0	3,6	36,1
Franco-Argilo-Arenosa	5,6	2,6	68	1,31	0,52	0	2,7	26,5
Argila	7,1	195	128	8,58	0,91	0	1,3	36,1

pH em água, KCl e CaCl<sub>2</sub> - Relação 1:2,5; P – K – Extrator Mehlich 1; Ca – Mg – Al – Extrator KCL 1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0; H + Al – Extrator Acetato de cálcio 0,5 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0; P-rem = Fósforo Remanescente

## 2.1. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

As análises dos indicadores microbiológicos foram conduzidas no Laboratório de Análises Microbiológicas do Solo – LAMISOL, Departamento de Microbiologia – DMB, da Universidade Federal de Viçosa.

## 2.2. Carbono da biomassa microbiana (CBM)

O carbono da biomassa microbiana foi extraído pelo método da fumigação e extração (Vance, Brookes *et al.*, 1987). Na segunda etapa, o carbono foi determinado por reação com permanganato de potássio (Bartlett e Ross, 1988). Foram pesadas duas alíquotas de 10 g de solo úmido de cada repetição dos tratamentos em dois tubos de centrífuga de 50 mL para as amostras que foram fumigadas e as não fumigadas. Os tubos destinados à fumigação foram colocados em dessecador acoplado a bomba de vácuo, com os fundos forrados com toalhas de papel umedecidas e juntamente com as amostras de solo foram colocados um frasco contendo pérolas de vidro e 25 mL de clorofórmio e um tubo contendo 5 mL de NaOH. O vácuo foi aplicado por até dois minutos após o início do borbulhamento do clorofórmio, quando a bomba foi desligada e o fechamento hermético do dessecador efetuado, para a incubação das amostras por 18 horas. Após esse período, os tubos com clorofórmio e NaOH foram retirados e a eliminação do clorofórmio residual das amostras foi efetuada pela aplicação intermitente de vácuo ao sistema, por no mínimo oito vezes antes da adição de 25 mL de  $K_2SO_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  às amostras fumigadas e não fumigadas. Posteriormente, os tubos foram agitados a 250 rpm por 1 hora, colocados para centrifugação a 4000 rpm por 5 minutos, antes da realização de filtração das amostras em papel de filtro quantitativo, para a obtenção dos extratos que foram utilizados nas determinações de carbono. A determinação do carbono da biomassa no extrato de solo foi realizada em alíquota de 2 mL de extrato obtido, após a adição de 1,1 mL de água destilada, 1,4 mL da Solução de Trabalho ( $Na_4P_2O_7$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $H_2SO_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $KMnO_4$   $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $MnSO_4$   $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ) e 1,5 mL de  $H_2SO_4$  concentrado. A mistura foi submetida a agitação por três inversões lentas e repouso por 2 horas, antes da leitura da absorbância a 495 nm, em espectrofotômetro. A concentração de carbono foi calculada a partir da curva de calibração resultante dos dados dos padrões de 0, 6, 12, 18 e 24  $mg \text{ mL}^{-1}$  de C-ácido oxálico (Bartlett e Ross, 1988).

### **2.3. Respiração basal**

A respiração basal foi determinada a partir dos valores de respiração obtidos após incubação das amostras em frascos acoplados ao respirômetro (Mod. TR-RM8 Respirometer Multiplexer – Sable Systems) equipado com detector de CO<sub>2</sub> a infravermelho (Heinemeyer, Insam *et al.*, 1989; Alef, 1995).

### **2.4. Atividade enzimática**

#### **2.4.1. Fosfatase ácida**

A atividade da fosfatase ácida foi determinada por espectrometria, tendo o p-nitrofenil como substrato e o p-nitrofenol como produto da reação enzimática (Tabatabai, 1994). A determinação foi realizada em um tubo de ensaio contendo 1 g de solo (peso úmido) após a adição de 0,2 mL de tolueno, 4 mL de tampão universal MUB (pH 6,5), 1 mL de solução de p-nitrofenil fosfato em tampão MUB e agitação dos tubos em Vortex por alguns segundos. O tubo foi vedado com rolha de borracha ou Parafilm e incubado em banho-maria a 37 °C por 1 hora, seguindo-se a adição de 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,5 mol L<sup>-1</sup> e 4 mL de NaOH e agitação por alguns segundos, antes da suspensão de solo ser passada através de papel de filtro quantitativo. A intensidade da cor amarela do filtrado foi determinada por espectrometria no comprimento de onda de 400 – 420 nm. A concentração de p-nitrofenol foi calculada a partir de gráfico da curva de calibração resultante dos dados dos padrões de 0, 10, 20, 30, 40 e 50 µg de p-nitrofenol.

#### **2.4.2. Fosfatase básica**

O procedimento para a determinação da fosfatase básica foi similar ao da fosfatase ácida (Tabatabai, 1994), excetuando-se o valor do pH do tampão MUB utilizado (pH 11) e pelo preparo da solução de p-nitrofenil nesse mesmo

tampão. A intensidade da cor amarela do filtrado foi determinada por espectrometria no comprimento de onda de 400 – 420 nm. A concentração de p-nitrofenol foi calculada a partir da curva de calibração.

### **2.4.3. $\beta$ – glicosidase**

A atividade da enzima  $\beta$ -glicosidase foi determinada por espectrometria, tendo o p-nitrofenil- $\beta$ -D-glicosídeo como substrato e o p-nitrofenol como produto da reação enzimática (Eivazi e Tabatabai, 1988). O procedimento requer a adição em tubo de ensaio de 1 g de solo (peso úmido), 0,25 mL de tolueno, 4 mL de MUB (pH 6,0), 1 mL de solução de p-nitrofenil- $\beta$ -D-glicosídeo em MUB (pH 6,0), agitação por alguns segundos em Vortex e vedação com rolha ou Parafilm para a incubação em banho-maria a 37 °C por 1 hora. Após a incubação, foram adicionados 1 mL de  $\text{CaCl}_2$  0,5 mol L<sup>-1</sup> e 4 mL de THAM (Tris-hidroximetilaminometano) 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 12, e o tubo foi agitado por alguns segundos antes da filtração da suspensão em papel de filtro quantitativo. Posteriormente, a intensidade da cor amarela do filtrado foi determinada em espectrofotômetro ajustado para o comprimento de onda de 400 nm. A concentração de p-nitrofenol foi calculada a partir da curva de calibração resultante dos dados dos padrões de 0, 10, 20, 30, 40 e 50  $\mu\text{g}$  de p-nitrofenol.

### **2.4.4. Nitrificação potencial**

A análise da nitrificação potencial foi feita segundo método proposto por Belser e Mays (1980), descrito em Hart, Stark *et al.* (1994). A taxa de produção de N-NO<sub>3</sub> foi calculada segundo metodologia descrita por (Yang, Skogley *et al.*, 1998). Para esse procedimento, foi feita a adição de 7,5 g da amostra de solo em um erlenmeyer, juntamente com 50 mL de uma solução contendo 1,5 mL de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 mol L<sup>-1</sup>, 3,5 mL de solução K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 mol L<sup>-1</sup>, 15 mL de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 mmol L<sup>-1</sup>, água destilada q.s.p. 1000 mL, com pH ajustado para 7,2. O erlenmeyer foi colocado em agitador orbital a 180 rpm, em temperatura

ambiente, seguindo-se a retirada de alíquotas de 3,5 mL da suspensão após a incubação por 2, 4, 22 e 24h, e colocação imediata em gelo até o momento da centrifugação a 4°C e 4000 x g por 20 minutos. O sobrenadante foi recolhido e submetido a uma nova centrifugação por 10 minutos nas mesmas condições, sendo o novo sobrenadante filtrado e recolhido em tubo de polipropileno, para conservação a -20 °C até o momento da análise.

A dosagem de NO<sub>3</sub>-N foi realizada pelo método do salicilato de sódio, que envolve uma reação de substituição aromática eletrofílica, na qual o salicilato reage com os íons nitrônio (NO<sub>2</sub><sup>+</sup>) para formar predominantemente compostos nitrobenzóicos, conforme Yang, Skogley *et al.* (1998). Foram adicionados em tubos de ensaio 0,5 mL do filtrado, 0,25 mL de solução de TRI (1 g de salicilato de Na; 0,2 g de NaCl; 0,1 g de sulfamato de NH<sub>4</sub> em 100 mL de NaOH 0,01 mol L<sup>-1</sup>) para reagir e gerar coloração amarela, que é proporcional à concentração de N-NO<sub>3</sub>. O tubo foi colocado em estufa a 105 °C por 12 a 14 h, seguindo-se ao resfriamento e a adição ao resíduo, branco seco, de 0,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Após incubação de 5 a 10 minutos, foram dispensados 2,5 mL de água destilada cuidadosamente pelas paredes do tubo e realizada nova incubação de 5 a 10 minutos, seguindo-se adição de 2,5 mL de solução de NaOH 40%. Após o resfriamento em temperatura ambiente, foi realizada a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 410 nm.

Procedimento semelhante foi realizado com solução de KNO<sub>3</sub> para obtenção dos padrões de NO<sub>3</sub>-N. A concentração de NO<sub>3</sub>-N foi calculada a partir de gráficos da curva de calibração resultante dos dados dos padrões de 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 mg L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub>.

## **2.5. Análise da diversidade genética**

### **2.5.1. Extração de DNA total do solo**

A extração e purificação do DNA total das amostras de solo foram realizadas com o kit PowerSoil™ DNA (MoBio Laboratories Inc. – Carlsbad, CA, USA), seguindo as recomendações do fabricante. A verificação do DNA purificado foi feita em gel de agarose 0,8%, após a coloração com brometo de

etídio. Foi aplicado 1 µL de cada amostra juntamente com o padrão de massa, DNA do fago lambda (cada µL correspondendo a 25 ng de DNA), para proceder a quantificação do DNA das amostras sob luz ultravioleta (UV) em transiluminador 2020E UV/White (Stratagene – Califórnia, USA).

### 2.5.2. PCR

A reação da polimerase em cadeia foi feita conforme descrito em Gelsomino e Cacco (2006). Para amplificar a região do gene rDNA 16S de bactéria e 18S para fungo, foram utilizados os primers descritos na tabela 3 para bactéria e fungos. Um grampo GC foi adicionado ao terminal 5' do iniciador F984GC e FR1GC, para prevenir a completa desnaturação dos amplicons durante a eletroforese com gradiente desnaturante (Muyzer, Dewaal *et al.*, 1993). Para proceder a amplificação, em cada tubo de reação foram adicionados: 5,0 µL de tampão específico da enzima GoTaq® 5X, 2,0 µL de cada dNTP 2,5 mmol L<sup>-1</sup>, 0,5 µL de cada iniciador 0,2 µmol L<sup>-1</sup>, 1,0 µL de BSA (albumina sérica bovina) 2 µg µL<sup>-1</sup> (Kreader, 1996), 0,5 µL de formamida deionizada 2% (v/v), 20 ng de DNA total do solo, 2 U de GoTaq® DNA polimerase (Promega – Madison, WI, USA), água Milli-Q esterilizada para um volume final de 25 µL de reação. No PCR, para amplificar bactéria foi feita uma “touchdown” PCR de modo a evitar amplificações não específicas (Don, Cox *et al.*, 1991). Durante a “touchdown” PCR a temperatura de anelamento iniciou com 64 °C, decrescendo 1 °C a cada ciclo até chegar em 54 °C, temperatura mantida nos próximos 25 ciclos. A PCR foi realizada em termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf – Germany), nas seguintes condições: o ciclo de desnaturação inicial das fitas de DNA foi de 5 minutos a 94 °C, seguindo-se 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto para o anelamento dos iniciadores na temperatura apropriada e 1 minuto a 72 °C, com o último ciclo de extensão por 10 minutos a 72 °C. A verificação dos produtos da PCR foi feita em gel de agarose a 1,2 %, após a coloração com brometo de etídio. Foram aplicados 5 µL de cada amostra juntamente com o marcador de tamanho DNA Ladder – 100 bp (Invitrogen – Califórnia, USA). Foi realizada Nested-PCR de

fungos filamentosos Oros-Sichler, Gomes *et al.* (2006), em que os primers utilizados na primeira reação foram NS1 e EF3, e na segunda FF390 e FR1GC.

### **2.5.3. Microrganismos marcadores do DGGE**

Foram utilizadas culturas puras das bactérias *Bacillus cereus*, *Streptomyces setonii*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas putida* e *Xanthomonas vesicatoria* representando os grupos do domínio Bacteria, e para fungos, usou-se DNA extraído de solo de mata. O DNA destes microrganismos foi extraído, quantificado e amplificado com os mesmos primers utilizados para amplificação de DNA dos solos estudados.

### **2.5.4. DGGE – Eletroforese em gel com gradiente desnaturante**

A eletroforese foi realizada utilizando-se o equipamento “DCode® Universal Mutation Detection System” (BIO-Rad – Califórnia USA). Os produtos de PCR foram aplicados em volume de 20 µL, juntamente com 15 µL do tampão da amostra (azul de bromofenol 0,05 %, xileno cianol 0,05 %, glicerol 70% e TAE 1X), diretamente no gel de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 37,5:1) a 8 % (p/v) em tampão tris-acetato-EDTA – TAE 1X (Tris base 40 mM; ácido acético glacial 20 mM; Na<sub>2</sub>.EDTA.2H<sub>2</sub>O 10 mmol L<sup>-1</sup>, pH 8,0). A variação do gradiente desnaturante, voltagem, temperatura e duração da corrida estão descritos na tabela 4. O gradiente foi formado com a mistura de duas soluções estoque de poliacrilamida a 8%, uma com 100% dos agentes desnaturantes, formamida deionizada 40% e uréia 7 mol L<sup>-1</sup> (Modelo 475 Gradient Delivery System – BIO-Rad Califórnia, USA) e a outra com 0% de agente desnaturante. Além das soluções estoque para a formação do gradiente, foram utilizados 130 µL de persulfato de amônio – APS (polimerizador), 16 µL de TEMED – N,N,N',N'-tetrametiletileno diamino (catalisador) e 50 µL do corante para visualização do gradiente (azul de

bromofenol 0,5%, xileno cianol 0,5% e TAE 1X). O gel foi mantido no suporte de montagem por no mínimo 2 horas para polimerizar por completo, e após esse período foi acoplado ao equipamento e aplicadas as amostras nos géis. A corrida eletroforética seguiu as condições descritas na tabela 4. Ao término da eletroforese, o gel foi corado por 20 minutos com solução 1X de SYBR® Gold (Invitrogen™ – Molecular Probes™, Eugene, Oregon, USA), conforme as recomendações do fabricante, não havendo necessidade da etapa de descoloração (Valaskova e Baldrian, 2009). A imagem do gel sob luz UV foi capturada e digitalizada pelo Eagle Eye II Still Video System (Stratagene – Califórnia, USA).

**Tabela 3** – Sequências dos oligonucleotídeos usadas para amplificação dos fragmentos do rDNA 16S para bactéria e 18S para fungo.

Oligos	Alvo do rDNA 16s e 18s	Sequência (5'-3')	Referência
R1378	Bactéria (1492-1513)	CTACGG(T/C)TACCTTGTTACGAC	(Gelsomino e Cacco, 2006)
F984GC	Bactéria (968-984)	gc-AACGCGAAGAACCTTAC	(Heuer, Krsek <i>et al.</i> , 1997)
GC-clamp (gc.)		CGCCCGGGGCGCGCCCGGGCGGGGCGGG GGCACGGGGGG	(Nubel, Engelen <i>et al.</i> , 1996)
NS1	Fungo filamentoso	GTAGTCATATGCTTGTCTC	(Hoshino e Morimoto, 2008)
EF3	Fungo filamentoso	TCCTCTAAATGACCAAGTTTG	(Hoshino e Morimoto, 2008)
FF390	Fungo filamentoso	CGATAACGAACGAGACCT	(Hoshino e Morimoto, 2008)
FR1GC	Fungo filamentoso	CCCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGG GGCACGGGCCGAICCATTC AATCGGTAIT	(Vainio e Hantula, 2000)

**Tabela 4** – Relação da porcentagem do gel (acrilamida/bisacrilamida) e condições eletroforéticas para cada grupo analisado

Grupo	Gel %	Gradiente (%)	Voltagem (V)	Temperatura (°C)	Tempo (h)
Bactéria	8	45 - 60	60	60	16
Fungo filamentososo	8	40- 55	60	60	16

### **2.5.5. Processamento das imagens dos géis de DGGE**

As imagens dos géis de DGGE foram analisadas com o programa Bionumerics, V.6.0 (Applied Maths, St. Martens Latem, Belgium). A subtração do background foi feita de acordo com a análise espectral dos géis e as raías dos géis foram normalizadas.

### **2.5.6. Análises de agrupamento**

As análises de agrupamento das impressões digitais genotípicas (genetic fingerprint) dos tratamentos realizados no solo foram feitos com o programa Bionumerics V. 6.0 (Applied Maths Latem, Belgium). Os dendrogramas foram construídos com o coeficiente binário de Dice, baseado em bandas comuns e diferentes, utilizados no cálculo da matriz de similaridade, e análise de agrupamento pelo método não ponderado de conjunto de pares por médias aritméticas (UPGMA – unweighted pair group method using arithmetic averages).

### **2.5.7. Análises de diversidade, equitabilidade, riqueza e dominância.**

As análises de diversidade, equitabilidade, riqueza e dominância foi realizada no programa DivEs V. 2.0 (Rodrigues, 2005), com dados (quantitativo e qualitativo) extraídos do géis de DGGE pelo programa Bionumerics V. 6.0.

## **2.6. Extração de nematóides do solo**

Para extração dos nematóides do solo, foi seguida a metodologia do Funil de Baermann (Baermann, 1917), descrito em Southey (1986). Cinquenta gramas de solo foram vertidos em peneira com papel toalha, e o conjunto foi colocado em funil com mangueira acoplada e fechada, acrescentando-se água de torneira até atingir amostra. Após 48 horas, a suspensão com os nematoides foi recolhida, e procedeu-se a identificação pelo uso de chaves de identificação e ou trabalhos de descrição de nematoides. A quantificação dos nematóides recuperados foi feita em câmara de Peters em microscópio de luz.

## **3. Resultados**

A atividade dos microorganismos presentes no solo foi afetada pela aplicação do ITCA quando comparado com o mesmo solo sem a aplicação do óleo (tabela 5). Houve redução na quantidade de microorganismos (CBM) em dois dos solos estudados, (o de textura Franco-Argilo-Arenosa e o de textura Argilosa), mas não houve diferença no de textura Franco-Arenosa. De uma maneira geral, o uso do ITCA nos solos classificados como de textura Franco-Argilo-Arenosa e Franco-Arenosa provocou redução ou não afetou a atividade das enzimas estudadas, exceto a da fosfatase básica, que aumentou. O maior aumento de atividade (94%) foi observado no solo com maior teor de argila. Excetuando-se a nitrificação e a respiração, que não variaram, o solo Argiloso foi o que apresentou as maiores reduções de atividade na presença do ITCA, comparando-se com os solos de menor teor de argila.

A análise do 'fingerprint' das comunidades bacterianas demonstrou haver similaridade de 90% entre o solo tratado com ITCA e o solo não-tratado (figura 1), em todas as três texturas estudadas. Com a aplicação do isotiocianato de alila (ITCA), houve pequeno aumento no número de bandas no DGGE no solo de textura Arenosa (Franco-arenoso). Ao solo de textura média (Franco-argilo-arenoso) e no solo Argiloso, a aplicação do composto causou redução de riqueza de bactéria (tabela 6).

Independentemente da textura, quando foi aplicado o ITCA observou-se redução da intensidade das bandas, (Figura 1), indicando redução do número de microorganismos de cada população presente no solo. Os índices de diversidade e de dominância da comunidade de bactérias (Tabela 6) não foram afetados pela aplicação do ITCA. Já o índice de equitabilidade foi afetado, um sinal de que algumas populações de bactérias foram favorecidas pela aplicação do ITCA.

**Tabela 5** - Atividade enzimática, respiração e carbono da biomassa com a aplicação de doses de isotiocianato de alila (ITCA), em solos com textura diferentes, após cinco dias de fumigação.

Solos/Tratamentos	CBM	Fosfatase ácida	Fosfatase básica	$\beta$ –glicosidase	Nitrificação	Respiração
Franco-Arenosa Test	13,9 D	91,0 B	39,1 D	21,4 C	2,6 BC	11,7 C
Franco-Arenosa ITCA	11,9 D	57,0 C	58,1 C	22,1 C	2,0 C	12,9 C
Franco-Argilo-Arenosa Test	40,5 B	81,0 B	83,1 B	26,6 C	3,1 AB	12,3 C
Franco-Argilo-Arenosa ITCA	15,5 D	77,3 B	109,5 A	31,3 C	3,5 A	17,7 BC
Argilosa Test	56,2 A	166,1 A	39,6 D	111,3 A	3,1 AB	28,0 AB
Argilosa ITCA	27,7 C	152,6 A	76,8 B	66,0 B	3,4 A	36,4 A

Média de 3 repetições. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Test – testemunha, CBM - carbono da biomassa ( $\mu\text{g C Kg}^{-1}$  solo seco), fosfatase ácida, fosfatase básica e  $\beta$ -glicosidase ( $\mu\text{g p-nitrophenol.g}^{-1}$  solo.h<sup>-1</sup>), nitrificação ( $\mu\text{g NO}_3\text{.g}^{-1}$  solo.h<sup>-1</sup>) e respiração ( $\mu\text{Mol C-CO}_2\text{.Kg}^{-1}\text{.h}^{-1}$ ).

A comunidade de fungo no solo foi afetada pela presença do ITC, visto que o 'fingerprint' mostrou alteração significativa. O solo argiloso tratado com ITCA apresentou 83% de similaridade com a testemunha. Já o solo de textura média (Franco-argilo-arenoso) tratado com ITCA exibiu 96% de similaridade com a testemunha, enquanto que o solo de textura arenosa foi 90% similar ao controle (Figura 1). O índice de diversidade de Shannon para o solo arenoso e de textura média tratados com ITCA aumentou em relação à testemunha, o oposto ocorreu no solo de textura argilosa. O índice de dominância de Berger-Parker no solo tratado com ITCA foi reduzido nos solos de textura média e arenosa, e aumentou no de textura argilosa. O índice de equitabilidade das populações de fungos no solo foi afetado pela aplicação de ITCA. No solo de textura arenosa e média, o índice de Hill aumentou, mas no solo de textura argilosa houve diminuição desse índice. A riqueza das espécies de fungos no solo tratado aumentou no solo de textura arenosa e média, e manteve-se no solo de textura argilosa.

A dose do ITCA utilizada no experimento, independentemente da textura do solo, não permitiu a recuperação de nematóides; que somente foram recuperados nos solos não tratados. No solo de textura arenosa, foram recuperados 4 ( $\pm 1$ ) nematóides bacteriófagos, 6 ( $\pm 1$ ) micófagos, nenhum predador de nematóides e 13 ( $\pm 2$ ) fitoparasitas. No solo de textura média foram recuperados 14 ( $\pm 2$ ) nematóides bacteriófagos, 2 ( $\pm 1$ ) micófagos, 1 predador de nematóides e 7 ( $\pm 2$ ) fitoparasitas. No solo argiloso, foram recuperados 24 ( $\pm 5$ ) bacteriófagos, 11 ( $\pm 3$ ) micófagos, 2 ( $\pm 1$ ) predadores de nematóides e 33 ( $\pm 6$ ) fitoparasitas.

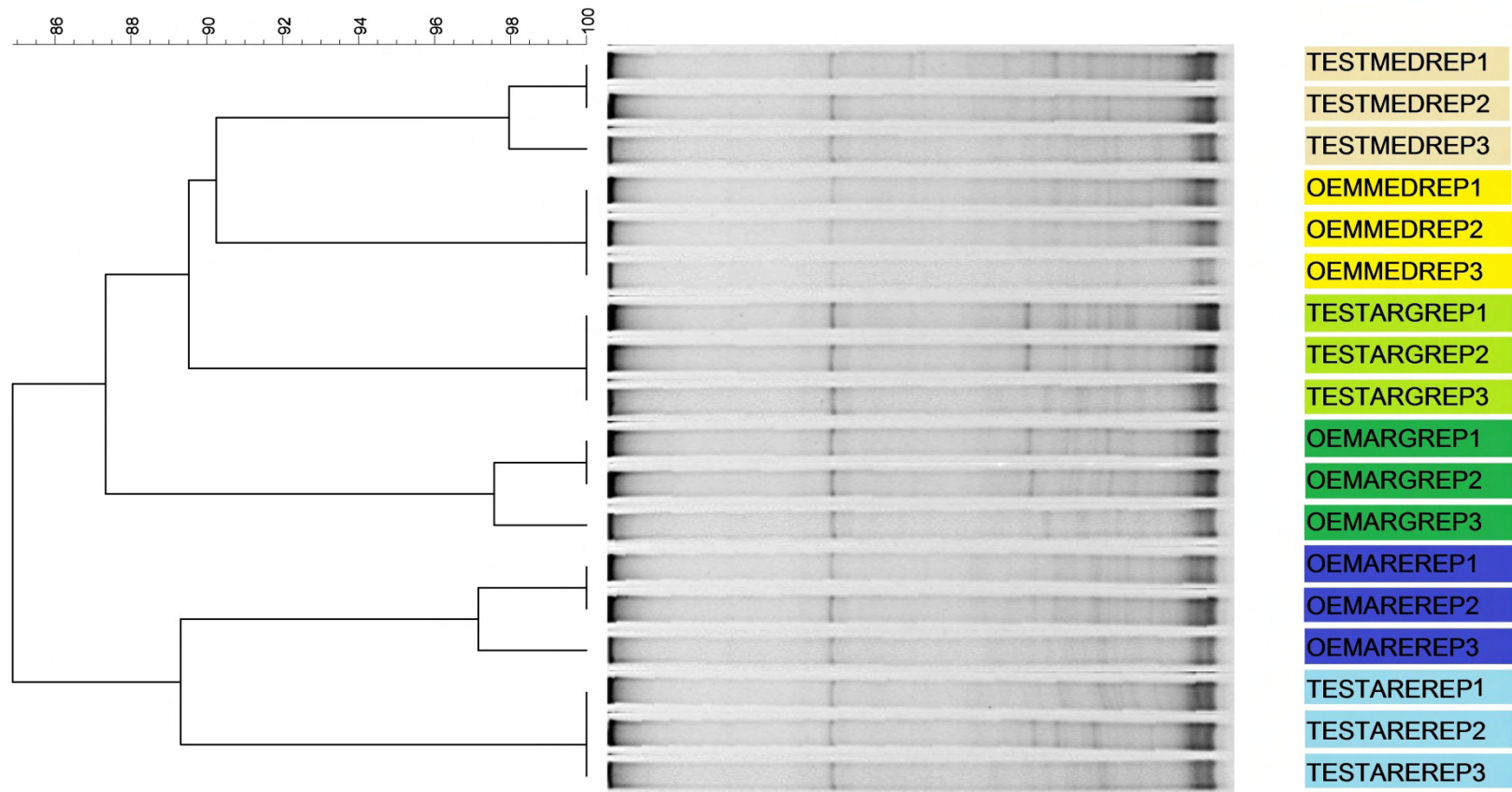


Figura 1- Dendrograma construído com os perfis de bandas da comunidade bacteriana presentes em três tipos de solo, tratados ou não com isotiocianato de alila (ITCA). As diferenças entre os perfis são indicadas pela porcentagem de similaridade. O dendrograma foi baseado no coeficiente de similaridade de Dice e análise de agrupamento pelo método não ponderado de conjunto de pares por médias aritméticas (UPGMA). (OEM = ITCA, Test = testemunha; are = arenoso, arg = argiloso e med = média; rep1, rep2 e rep 3 = repetições).

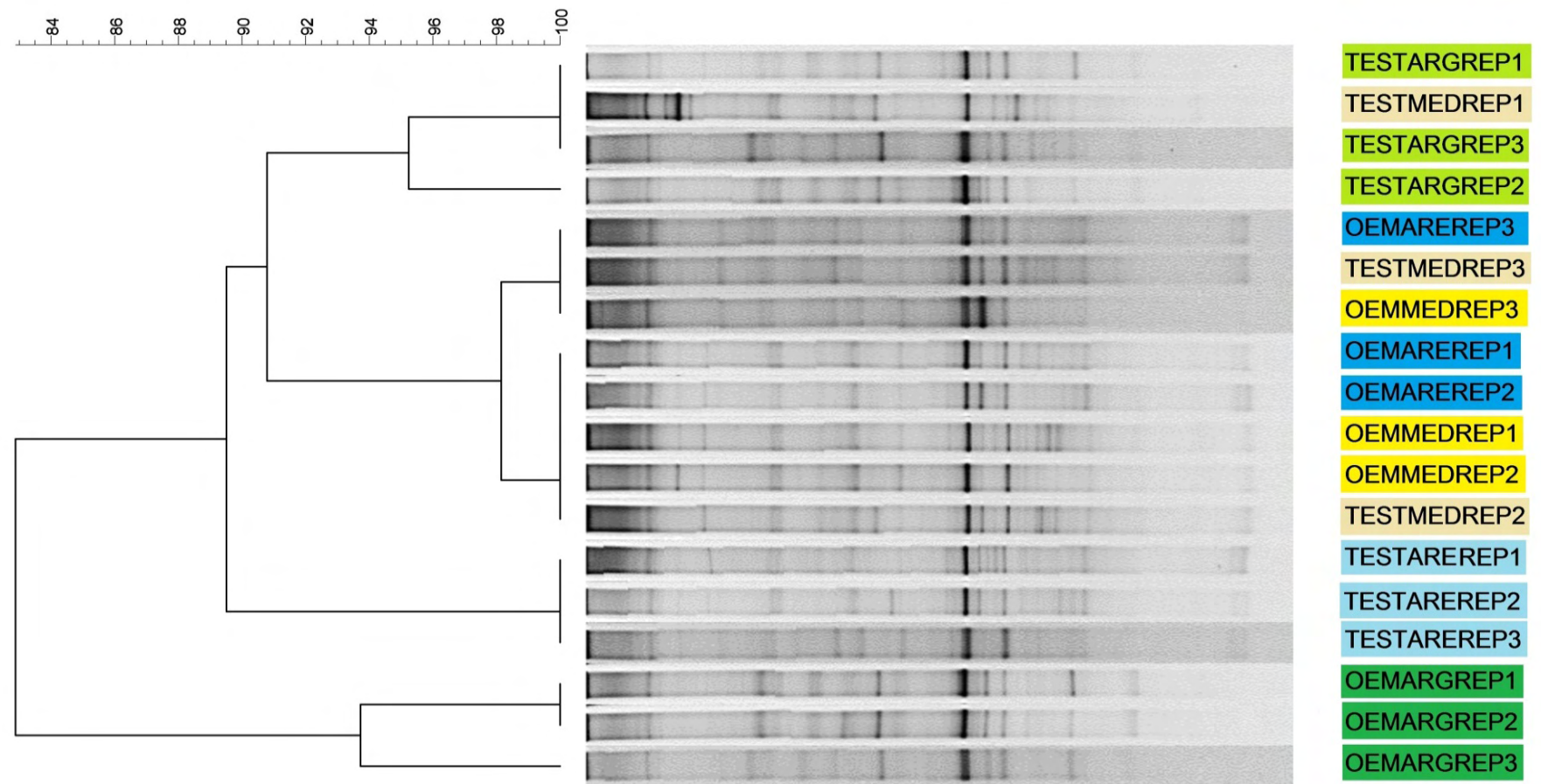


Figura 2- Dendrograma construído com os perfis de bandas da comunidade fúngica presentes em três tipos de solo, tratados ou não com isotiocianato de alila (ITCA). As diferenças entre os perfis são indicadas pela porcentagem de similaridade. O dendrograma foi baseado no coeficiente de similaridade de Dice e análise de agrupamento pelo método não ponderado de conjunto de pares por médias aritméticas (UPGMA). (OEM = ITCA, Test = testemunha; are = arenoso, arg = argiloso e med = média; rep1, rep2 e rep 3 = repetições).

**Tabela 6** -Índices de dominância, diversidade, equitabilidade e riqueza para população de bactérias e fungos em três solos com diferentes texturas, tratados ou não com isotiocianato de alila (ITCA).

	Dominância		Diversidade		Equitabilidade		Riqueza	
	Fungo	Bactéria	Fungo	Bactéria	Fungo	Bactéria	Fungo	Bactéria
Franco-Arenosa Test	0,40a	0,3 <sup>ns</sup>	0,72c	0,9 <sup>ns</sup>	3,1bc	3,2c	12b	25d
Franco-Arenosa ITCA	0,28b	0,3	0,80b	1,0	3,6ab	3,4b	14ab	31c
Franco-Argila-Arenosa Test	0,30b	0,3	0,73c	1,1	3,7 <sup>a</sup>	3,4b	11b	45a
Franco-Argila-Arenosa ITCA	0,27b	0,3	0,84ab	1,1	3,9 <sup>a</sup>	3,5b	15a	38b
ArgilaTest	0,31b	0,2	0,86 <sup>a</sup>	1,1	3,6ab	3,8a	17a	46a
Argila ITCA	0,37a	0,3	0,82b	1,1	3,3b	3,6ab	17a	40b

Média de 3 repetições. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ). ns - não significativo pelo teste Student (t). Dominância (Berger-Parker), diversidade (Shanon-Wiever), equitabilidade (Hill) e riqueza (número de bandas no DGGE).

#### 4. Discussão

O uso do ITCA nesse trabalho difere dos de outros autores devido esse ser um óleo essencial altamente concentrado ao contrário da massa de matéria fresca de brassicáceas incorporada ao solo. No trabalho de Omirou *et al.*, (2011), foi reportado que a presença do fenil isotiocianato (PITC) no material fresco de brássicas, quando incorporado ao solo, não afetou a atividade e diversidade dos microorganismos. Segundo esses autores, isso se deveu ao fato da toxicidade do PITC ser compensada pelo aumento na disponibilidade de nutrientes. Já a aplicação do composto puro no solo afetou significativamente a atividade dos microorganismos.

Neste trabalho, foi demonstrado que a textura dos solos teve influência na resposta das comunidades microbianas. Em solos de textura arenosa, o efeito do ITCA foi menor do que em solos de textura argilosa, pois foi nesses últimos que se observaram as maiores diferenças na biomassa microbiana associada às mais altas atividades enzimáticas e a respiração. Sabe-se que os microorganismos ali presentes estão mais adaptados às condições adversas, como a falta de água e nutrientes (Chau, Bagtzoglou *et al.*, 2011), o que lhes confere maior sobrevivência. Nos solos de textura média e argilosa a quantidade e diversidade natural de microorganismos presentes foram maiores, visto que nesses solos a estrutura física do solo proporciona maior disponibilidade de água, nutrientes e microporos para o crescimento dos microorganismos (Nannipieri, Ascher *et al.*, 2003; Chau, Bagtzoglou *et al.*, 2011; Hu, Lin *et al.*, 2011).

A respiração basal do solo argiloso aumentou, mas foi estatisticamente igual a testemunha quando este recebeu a aplicação do ITCA. Este aumento é decorrente da maior disponibilidade de nutrientes no solo, devido à morte de parte da população dos microorganismos, visto que o carbono da biomassa diminuiu com a aplicação do ITCA, corroborando com os resultados encontrados por (Omirou, Rousidou *et al.*, 2011).

A atividade enzimática dos microorganismos foi reduzida para a enzima Fosfatase ácida e  $\beta$ -glicosidase e aumentou para a enzima fosfatase alcalina

pela aplicação do ITCA. Esta redução da atividade enzimáticas dos microrganismos se deve pela diminuição do tamanho que cada população, visto que a biomassa microbiana reduziu então houve grandes mudanças no fingerprint bacteriano e de fungo. Em estudos com fumigantes sintéticos (Vapan sodio, Brometo de metila e Cloropicrin) resultados similares foram encontrados para a atividade enzimática e carbono da biomassa (Klose e Ajwa, 2004; Stromberger, Klose *et al.*, 2005; Yamamoto, Ultra *et al.*, 2008). A atividade da fosfatase alcalina neste trabalho aumentou, provavelmente pelo distúrbio causado pelo ITCA e as populações de microrganismos que produzem esta enzima aumentaram rapidamente no solo, pois neste as populações tendem a ficar em equilíbrio (Kassen e Rainey, 2004).

As fosfatases são fundamentais na mineralização do fósforo e, conseqüentemente, na ciclagem deste nutriente no ambiente. A redução da atividade destas enzimas não afeta somente a população de microrganismos, mas também a disponibilidade de fósforo para a planta, visto que a enzima catalisa a hidrólise de fósforo orgânico ao fósforo inorgânico, forma que é assimilada pelas plantas (Caldwell, 2005). As glicosidases podem ser encontradas em plantas, animais e microrganismos e catalisam reações de hidrólise de maltose e celobiose, cujos produtos são importantes fontes de energia para os microrganismos do solo (Caldwell, 2005). A redução da atividade destas enzimas pelo ITCA causa redução da disponibilidade de nutrientes, afetando o crescimento dos microrganismos.

A nitrificação potencial do solo, quando foi aplicado o ITCA, não foi afetada, mas foi sempre menor a nitrificação quando se aumentou o teor de areia nos solos, diminuiu no solo de textura arenosa e aumentou nos outros dois tipos de solo. Esta diferença na nitrificação é devida ao tipo e a diversidade de microrganismos nitrificantes que vivem em cada solo. Em solos de textura arenosa a diversidade destes microrganismos nitrificantes é menor de que em solos com mais argila. Assim pequenos distúrbios no equilíbrio das populações bacterianas favorece o crescimento das bactérias nitrificantes. Alguns ITCs já foram relatados diminuindo a taxa de nitrificação do solo, mas quando estes eram incorporados com matéria fresca da planta. Com o

incremento de  $\text{NH}_4^+$  oriundo do tecido vegetal, este estimulou a microbiota do solo, desfavorecendo as bactérias nitrificantes do solo, levando assim à diminuição da taxa de nitrificação do solo (Bending e Lincoln, 2000; Ryan, Kirkegaard *et al.*, 2006). Nos solos de textura média e argilosa, o desequilíbrio causado pelo ITCA nas populações microbianas foi maior, favorecendo o aumento da população de bactérias nitrificantes, aumentando assim a taxa de nitrificação destes solos.

Pelo fingerprint e os índices de diversidade e dominância das populações de bactérias, não houve diferenças significativas entre o solo tratado e o não-tratado. Essa resistência das populações de bactérias ao isotiocianato pode ser devido aos mecanismos de resistência das bactérias ao estresse. Um dos mecanismos mais eficientes para a sobrevivência das bactérias é a formação de biofilmes. Os biofilmes são formados pela adesão das bactérias às superfícies, incluindo as das partículas do solo, e há formação de uma camada de exopolissacarídeos, o que lhes confere proteção (Danhorn e Fuqua, 2007). Sabe-se que esses biofilmes protegem contra dissecação, raios ultravioletas, predação, compostos tóxicos e sinergismo para penetração no hospedeiro (Danhorn e Fuqua, 2007) e certamente conferiu proteção contra o ITCA. Durante o processo de fumigação ocorreu morte de parte dos microrganismos (redução CBM), aumentando assim a disponibilidade de nutrientes no solo. Esse “pulso” de acréscimo de biomassa prontamente disponível estimulou o crescimento de bactérias que se encontravam em populações pequenas no solo arenoso, a sua detecção pela técnica de DGGE, aumentando assim a riqueza das populações de bactéria no solo quando tratado com ITCA.

A comunidade de fungos foi mais afetada pela aplicação do ITCA do que a de bactérias. Este maior distúrbio na comunidade fúngica foi mais acentuado nos solos de textura arenosa e média, onde a diversidade de fungos é menor. Nestes solos, o índice de dominância foi reduzido, pois o ITCA controlou principalmente aquelas populações mais abundantes, favorecendo a multiplicação das populações menos abundantes. Essa alteração resulta em aumento no índice de diversidade e riqueza. No solo de textura argilosa, como

o número de microrganismos é superior aos solos de textura média e arenosa, o ITCA controlou todas as populações, não favorecendo nenhuma, o que explica a falta de variação da riqueza em resposta ao tratamento.

Como demonstrado, os nematóides apresentam alta sensibilidade aos ITCs. A comunidade de nematóides dos solos estudados foi reduzida drasticamente pelo ITCA, corroborando com os resultados encontrados quando foi incorporado material vegetal de brassicas ao solo (Henderson, Riga *et al.*, 2009b; Gruver, Weil *et al.*, 2010).

Resultados satisfatórios também foram encontrados no controle de fungos de substrato, *Fusarium oxysporum* (Smolinska, Morra *et al.*, 2003), *Rhizoctonia solani* e *Pythium* spp. (Chung, Huang *et al.*, 2002; Cohen, M.F., Yamasaki, H. *et al.*, 2005), sementes de plantas invasoras (Brown e Morra, 1996) e bactérias (Charron, Sams *et al.*, 2002). Assim, era esperado que o ITCA agisse principalmente sobre microrganismos abundantes no solo e com recolonização lenta, como os fitopatógenos, e não afetasse a microbiota benéfica do solo, como foi observado neste trabalho, em que se demonstrou pequeno efeito do ITCA sobre a estrutura e algumas funções das comunidades microbianas do solo.

Em contraste com a maioria dos estudos que se concentram na incorporação do tecido vegetal ao solo, a aplicação do ITCA puro ou formulado ao solo apresenta a vantagem de padronização da quantidade de produto aplicado, garantindo assim máxima eficiência no controle de fitonematóides. A aplicação direta do produto ao solo (ITCA) elimina a necessidade de cultivo da planta na área, liberando-a para ser cultivada com plantas de valor econômico. A eficácia inconsistente de incorporação de materiais vegetais frescos tem sido atribuída a vários fatores, como a produção de biomassa insuficiente, a ineficácia da ruptura do tecido vegetal e quantidade de isotiocianato produzido pela planta (Bending e Lincoln, 1999; Rahman e Somers, 2005). O uso do ITCA oriundo de *Brassica juncea* traz outro benefício, uma vez que a semente da espécie, onde se encontra a maior concentração do glicosinolato, também é rica em óleo, o qual apresenta características desejáveis para uso como biocombustível (Vig, Rampal *et al.*, 2009). Durante o processo de extração do

óleo da semente utilizando-se metodologias adequadas não há perda da atividade da enzima mirosinase, permitindo assim a hidrólise do glicosinolato em isotiocianato, podendo o mesmo ser usado para o controle de fitopatógenos.

## **5. Conclusão**

O uso do isotiocianato de alila interferiu na atividade metabólica dos microrganismos, principalmente no solo de textura argilosa.

A aplicação de ITCA em solos das três texturas resultou na redução do carbono da biomassa e da atividade da enzima fosfatase ácida.

A atividade da enzima fosfatase básica foi aumentada pela aplicação do ITCA nos três solos.

Pelo fingerprint e os índices de diversidade e dominância, a comunidade bacteriana do solo não foi afetada pela aplicação do ITCA, mas a comunidade de fungos do solo sofreu um pequeno distúrbio.

A comunidade de nematóides do solo foi drasticamente reduzida pela aplicação do ITCA.

## 6. Referências Bibliográficas

AGUIAR, N. D. C. **Tecnologia de uso da torta e do óleo essencial de mostarda no controle de *Meloidogyne exigua***. 2008. 65 (Mestrado em Fitopatologia). Fitopatologia, Dissertação de Mestrado em Fitopatologia. UFV/Viçosa

ALEF, K. Soil respiration. In: ALEF, K. e NANNIPIERI, P. (Ed.). **Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry**. London: Academic Paris, 1995. p.214-219.

BAERMANN, G. Eine einfache Methode Zur Auffindung von Ankvlostomum (nematoden) Larven in Erdproben. **Tijdschr. Ned.-Indie**, v. 57, p. 131-137, 1917.

BARTLETT, R. J.; ROSS, D. S. Colorimetric Determination of Oxidizable Carbon in Acid Soil Solutions. **Soil Science Society of America Journal**, v. 52, n. 4, p. 1191-1192, 1988.

BELSER, L. W.; MAYS, E. L. Specific-Inhibition of Nitrite Oxidation by Chlorate and Its Use in Assessing Nitrification in Soils and Sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 505-510, 1980.

BENDING, G. D.; LINCOLN, S. D. Characterisation of volatile sulphur-containing compounds produced during decomposition of *Brassica juncea* tissues in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, n. 5, p. 695-703, 1999.

BENDING, G. D.; LINCOLN, S. D. Inhibition of soil nitrifying bacteria communities and their activities by glucosinolate hydrolysis products. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 32, n. 8-9, p. 1261-1269, 2000.

BROWN, P. D.; MORRA, M. J. Hydrolysis products of glucosinolates in *Brassica napus* tissues as inhibitors of seed germination. **Plant and Soil**, v. 181, n. 2, p. 307-316, 1996.

\_\_\_\_\_. Control of soil-borne plant pests using glucosinolate-containing plants. **Advances in Agronomy**, v. 61, p. 167-231, 1997.

CALDWELL, B. A. Enzyme activities as a component of soil biodiversity: A review. **Pedobiologia**, v. 49, n. 6, p. 637-644, 2005.

CASTRO, D. B. **Uso do óleo essencial de mostarda no controle de *Meloidogyne enterolobii* (= *M. mayaguensis*) em pomar de goiabeira**. 2010. 53 (Mestrado em Fitopatologia). Fitopatologia, Dissertação de Mestrado em Fitopatologia. UFV/Viçosa

CHARRON, C. S.; SAMS, C. E.; CANADAY, C. H. Impact of glucosinolate content in broccoli (*Brassica oleracea* (Italica group)) on growth of *Pseudomonas marginalis*, a causal agent of bacterial soft rot. **Plant Disease**, v. 86, p. 629-632, 2002.

CHAU, J. F.; BAGTZOGLU, A. C.; WILLIG, M. R. The Effect of Soil Texture on Richness and Diversity of Bacterial Communities. **Environmental Forensics**, v. 12, n. 4, p. 333-341, 2011.

CHEN, Y. R. et al. Phenylethyl isothiocyanate induces apoptotic signaling via suppressing phosphatase activity against c-Jun N-terminal kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 42, p. 39334-39342, 2002.

CHUNG, W. C. et al. Effect of ground Brassica seed meal on control of Rhizoctonia damping-off of cabbage. **Canadian Journal of Plant Pathology- Revue Canadienne De Phytopathologie**, v. 24, n. 2, p. 211-218, 2002.

COHEN, M. F.; YAMASAKI, H.; MAZZOLA, M. *Brassica napus* seed meal soil amendment modifies microbial community structure, nitric oxide production and incidence of Rhizoctonia root rot. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 37, p. 1215-1227, 2005.

COHEN, M. F.; YAMASAKI, H.; MAZZOLA, M. Brassica napus seed meal soil amendment modifies microbial community structure, nitric oxide production and incidence of Rhizoctonia root rot. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 37, n. 7, p. 1215-1227, 2005.

COLLINS, H. P. et al. Soil microbial, fungal, and nematode responses to soil fumigation and cover crops under potato production. **Biology and Fertility of Soils**, v. 42, n. 3, p. 247-257, 2006.

DANHORN, T.; FUQUA, C. Biofilm formation by plant-associated bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 61, p. 401-422, 2007.

DAYAN, F. E.; CANTRELL, C. L.; DUKE, S. O. Natural products in crop protection. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 12, p. 4022-4034, 2009.

DON, R. H. et al. Touchdown Pcr to Circumvent Spurious Priming during Gene Amplification. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 14, p. 4008-4008, 1991.

DROBNICA, L. et al. ANTIFUNGAL ACTIVITY OF ISOTHIOCYANATES AND RELATED COMPOUNDS .I. NATURALLY OCCURING ISOTHIOCYANATES AND THEIR ANALOGUES. **Applied Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 701-&, 1967.

DUNIWAY, J. M. Status of chemical alternatives to methyl bromide for pre-plant fumigation of soil. **Phytopathology**, v. 92, p. 1337-1343, 2002.

EIVAZI, F.; TABATABAI, M. A. Glucosidases and Galactosidases in Soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 20, n. 5, p. 601-606, 1988.

ELLENBY, C. Control of the Potato-Root Eelworm, *Heterodera rostochiensis* Wollenweber, by Allyl Isothiocyanate, the Mustard Oil of *Brassica nigra* L. **Annals of Applied Biology**, v. 32, n. 3, p. 237-239, 1945.

FERRAZ, S.; FREITAS, L. G. Use of Plants and Natural Products. In: CHEN, Z. X.; CHEN, S. Y., *et al* (Ed.). **Nematology: Advances and Perspectives. Nematode Management and Utilization**, v.2, 2004. p.931-977.

GELSOMINO, A.; CACCO, G. Compositional shifts of bacterial groups in a solarized and amended soil as determined by denaturing gradient gel electrophoresis. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 91-102, 2006.

GOULART, R. R. **Biofumigação com Brassica rapa para o controle de *Meloidogyne exigua* em diferentes texturas e umidades do solo**. 2007. 52 (Mestrado em Fitopatologia). Fitopatologia, Dissertação de Mestrado em Fitopatologia. UFV/Viçosa

GRUVER, L. S. *et al*. Brassicaceous and rye cover crops altered free-living soil nematode community composition. **Applied Soil Ecology**, v. 45, n. 1, p. 1-12, 2010.

HART, S. C. *et al*. Nitrogen mineralization, immobilisation and nitrification. In: WEAVER, R. W.; ANGLE, J. S., *et al* (Ed.). **Methods of Soil Analysis. Part 2, Microbiological and Biochemical Properties**. Madison, Wisconsin: Soil Science Society of America, 1994. p.985-1018.

HEINEMEYER, O. *et al*. Soil Microbial Biomass and Respiration Measurements - an Automated Technique Based on Infrared Gas-Analysis. **Plant and Soil**, v. 116, n. 2, p. 191-195, 1989.

HENDERSON, D. R. *et al*. Mustard biofumigation disrupts biological control by *Steinernema* spp. nematodes in the soil. **Biological Control**, v. 48, n. 3, p. 316-322, 2009a.

HENDERSON, D. R. et al. Mustard Biofumigation Disrupts Biological Control by *Steinernema* Spp. Nematodes in the Soil. **Journal of Nematology**, v. 41, n. 4, p. 337-337, 2009b.

HEUER, H. et al. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 8, p. 3233-3241, 1997.

HOSHINO, Y. T.; MORIMOTO, S. Comparison of 18S rDNA primers for estimating fungal diversity in agricultural soils using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 54, n. 5, p. 701-710, 2008.

HU, J. L. et al. Microbial functional diversity, metabolic quotient, and invertase activity of a sandy loam soil as affected by long-term application of organic amendment and mineral fertilizer. **Journal of Soils and Sediments**, v. 11, n. 2, p. 271-280, 2011.

JORDAN, D. et al. Evaluation of Microbial Methods as Potential Indicators of Soil Quality in Historical Agricultural Fields. **Biology and Fertility of Soils**, v. 19, n. 4, p. 297-302, 1995.

KASSEN, R.; RAINEY, P. B. The ecology and genetics of microbial diversity. **Annual Review of Microbiology**, v. 58, p. 207-231, 2004.

KLOSE, S.; AJWA, H. A. Enzyme activities in agricultural soils fumigated with methyl bromide alternatives. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 36, n. 10, p. 1625-1635, 2004.

KREADER, C. A. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 1102-1106, 1996.

LIMA, A. O. **Uso da Mostarda (*Brassica rapa*) como biofumigante de solo no controle de *Meloidogyne incognita***. 2006. 55 (Mestrado em Fitopatologia). Fitopatologia, Dissertação de Mestrado em Fitopatologia. UFV/Viçosa

MAZZOLA, M.; ZHAO, X. W. Brassica juncea seed meal particle size influences chemistry but not soil biology-based suppression of individual agents inciting apple replant disease. **Plant and Soil**, v. 337, n. 1-2, p. 313-324, 2010.

MOJTAHEDI, H. et al. Managing *Meloidogyne chitwoodi* on Potato with Rapeseed as Green Manure. **Plant Disease**, v. 77, n. 1, p. 42-46, 1993.

MUNOZ-LEOZ, B. et al. Tebuconazole application decreases soil microbial biomass and activity. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 43, n. 10, p. 2176-2183, 2011.

MUYZER, G.; DEWAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of Complex Microbial-Populations by Denaturing Gradient Gel-Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes-Coding for 16s Ribosomal-Rna. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.

NANNIPIERI, P. et al. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, v. 54, n. 4, p. 655-670, 2003.

NIEMI, R. M. et al. Microbial toxicity and impacts on soil enzyme activities of pesticides used in potato cultivation. **Applied Soil Ecology**, v. 41, n. 3, p. 293-304, 2009.

NUBEL, U. et al. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 19, p. 5636-5643, 1996.

OLIVEIRA, R. D. L. et al. Glucosinolate content and nematicidal activity of Brazilian wild mustard tissues against *Meloidogyne incognita* in tomato. **Plant and Soil**, v. 341, n. 1-2, p. 155-164, 2011.

OMIROU, M. et al. The Impact of Biofumigation and Chemical Fumigation Methods on the Structure and Function of the Soil Microbial Community. **Microbial Ecology**, v. 61, n. 1, p. 201-213, 2011.

OROS-SICHLER, M. et al. A new semi-nested PCR protocol to amplify large 18S rRNA gene fragments for PCR-DGGE analysis of soil fungal communities. **Journal of Microbiological Methods**, v. 65, n. 1, p. 63-75, 2006.

POTTER, M. J.; DAVIES, K.; RATHJEN, A. J. Suppressive impact of glucosinolates in Brassica vegetative tissues on root lesion nematode *Pratylenchus neglectus*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 24, n. 1, p. 67-80, 1998.

POTTER, M. J. et al. Breeding to increase the concentration of 2-phenylethyl glucosinolate in the roots of *Brassica napus*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n. 8, p. 1811-1820, 2000.

RAHMAN, L.; SOMERS, T. Suppression of root knot nematode (*Meloidogyne javanica*) after incorporation of *Indian mustard* cv. Nemfix as green manure and seed meal in vineyards. **Australasian Plant Pathology**, v. 34, n. 1, p. 77-83, 2005.

REEVE, J. R. et al. Effects of soil type and farm management on soil ecological functional genes and microbial activities. **Isme Journal**, v. 4, n. 9, p. 1099-1107, 2010.

RODRIGUES, W. C. DivEs - Diversidade de espécies. **Software e Guia do Usuário**, 2005. Acesso em: 22.06.2011.

RYAN, M. H.; KIRKEGAARD, J. A.; ANGUS, J. F. Brassica crops stimulate soil mineral N accumulation. **Australian Journal of Soil Research**, v. 44, n. 4, p. 367-377, 2006.

SINHA, A. P.; AGNIHOTRI, V. P.; SINGH, K. Effect of Soil Fumigation with Vapam on the Dynamics of Soil Microflora and Their Related Biochemical-Activity. **Plant and Soil**, v. 53, n. 1-2, p. 89-98, 1979.

SMOLINSKA, U. et al. Isothiocyanates produced by Brassicaceae species as inhibitors of *Fusarium oxysporum*. **Plant Disease**, v. 87, n. 4, p. 407-412, 2003.

SOUTHEY, J. F. **Laboratory methods for work with plant and soil nematodes**. HMSO, 1986.

STROMBERGER, M. E. et al. Microbial populations and enzyme activities in soils fumigated with methyl bromide alternatives. **Soil Science Society of America Journal**, v. 69, n. 6, p. 1987-1999, 2005.

TABATABAI, M. A. Soil enzymes. In: WEAVER, R. W.; AUGLE, S., et al (Ed.). **Methods of Soil Analysis. Part 2. Microbiological and Biochemical Properties**. Madison: Soil Science Society America v.5, 1994. p.775-833.

UNEP. Montreal Protocol on Substances that deplete the ozone layer : United Nations Environment Programme. Methyl bromide technical options committee. **Assessment of Alternative to Methyl Bromide**, 1998.

VAINIO, E. J.; HANTULA, J. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. **Mycological Research**, v. 104, p. 927-936, 2000.

VALASKOVA, V.; BALDRIAN, P. Denaturing gradient gel electrophoresis as a fingerprinting method for the analysis of soil microbial communities. **Plant Soil and Environment**, v. 55, n. 10, p. 413-423, 2009.

VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. An Extraction Method for Measuring Soil Microbial Biomass-C. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 19, n. 6, p. 703-707, 1987.

VIG, A. P. et al. Bio-protective effects of glucosinolates - A review. **Lwt-Food Science and Technology**, v. 42, n. 10, p. 1561-1572, 2009.

WANG, A. S. et al. Impact of Indian Mustard (*Brassica juncea*) and Flax (*Linum usitatissimum*) Seed Meal Applications on Soil Carbon, Nitrogen, and Microbial Dynamics. **Applied and Environmental Soil Science**, v. 2012, p. 1-14, 2012.

YAMAMOTO, T. et al. Effects of methyl bromide fumigation, chloropicrin fumigation and steam sterilization on soil nitrogen dynamics and microbial properties in a pot culture experiment. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 54, n. 6, p. 886-894, 2008.

YANG, J. E. et al. A simple spectrophotometric determination of nitrate in water, resin, and soil extracts. **Soil Science Society of America Journal**, v. 62, n. 4, p. 1108-1115, 1998.

## Capítulo 2 - Efeito da dose e tempo de fumigação com Isotiocianato de alila na comunidade microbiana do solo.

### 1. Introdução

O uso de pesticidas fumigantes foi utilizado por muitos anos para controlar fitopatógenos presentes no solo, e com a proibição da utilização de alguns destes produtos, novas alternativas estão sendo desenvolvidas. Para a substituição dos fumigantes sintéticos, o uso de partes de plantas ou compostos bioativos derivados dessas plantas apresentam grande potencial (Akhtar e Alam, 1993). Uma grande vantagem dessas plantas é que durante sua decomposição há a liberação de substâncias químicas inclusive voláteis, as quais atuam no controle de patógenos do substrato, processo esse denominado biofumigação (Unep, 1998). Além disso, podem estimular a atividade microbiana, inclusive aquela de microorganismos antagonistas aos nematóides (Bridge, 1996), melhorando a sustentabilidade do sistema agrícola.

Diversas plantas são conhecidas por apresentarem substâncias com efeito nematicida e, ou nematostático (Ferraz e Freitas, 2004). Dentre essas, merecem destaque as plantas da família Brassicaceae devido as potencialidades de seu uso no controle de fungos, bactérias e nematóides habitantes de solo (Drobnica, Zemanova *et al.*, 1967; Brown e Morra, 1997; Chen, Han *et al.*, 2002; Lima, 2006; Goulart, 2007; Dayan, Cantrell *et al.*, 2009; Vig, Rampal *et al.*, 2009; Oliveira, Dhingra *et al.*, 2011). Espécies da família Brassicaceae produzem metabólitos secundários como os glicosinolatos (Mojtahedi, Santo *et al.*, 1993; Potter, Davies *et al.*, 1998), que são encontrados em todos os tecidos da planta e armazenados nos vacúolos das células (Kirkegaard e Sarwar, 1998; Vig, Rampal *et al.*, 2009). Quando o tecido é rompido, glicosinolatos entram em contato com a enzima mirosinase (tioglucosídeo glucohidrolase, EC 3.2.3.1), a qual é armazenada separadamente nas células, resultando no processo de hidrólise e formação de nitrilas, epitionitrilas, tiocianatos e, ou isotiocianatos (Zasada e Ferris, 2003). Esses isotiocianatos constituem os principais ingredientes ativos no controle de fitonematoides.

O óleo essencial de mostarda (*Brassica juncea* (L.) Czern.) é rico em isotiocianato de alila, potente ingrediente ativo no controle de importantes espécies de fitonematoides (Lima, 2006; Goulart, 2007; Aguiar, 2008; Castro, 2010). Estudos sobre a dose efetiva para reduzir a densidade populacional foram feitos e observou-se que quando o tempo de fumigação é mais longo, pode-se reduzir a dose sem perder a eficiência de controle (Aguiar, 2008).

Um dos problemas relacionados ao uso de nematicidas sintéticos é o impacto negativo que eles causam ao ambiente. O brometo de metila, que ainda é usado para controle de nematóides, fungos e bactérias reduz a abundância de microrganismos no solo (Klose, Acosta-Martinez *et al.*, 2006). Já se sabe que populações de fungos e bactérias gram negativas são as mais afetadas (Ibekwe, Papiernik *et al.*, 2001; Hoshino e Matsumoto, 2007; Yamamoto, Ultra *et al.*, 2008). O fato de se usar biopesticidas não necessariamente garante que eles sejam ecologicamente corretos, pois acredita-se que eles também provoquem alterações na comunidade microbiana do solo. Contudo, estas interferências são menores quando comparadas com aquelas de produtos fumigantes (Gopal, Gupta *et al.*, 2007; Spyrou, Karpouzias *et al.*, 2009). Até o momento, pouco se conhece sobre o impacto do óleo essencial de mostarda ou seu ingrediente ativo, o isotiocianato de alila (ITCA) na microbiota do solo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da dose do ITCA e da duração da fumigação na microbiota do solo.

## **2. Material e métodos**

Amostras de quinhentos gramas de solo com textura argilosa (idem capítulo anterior) foram tratados com óleo essencial de mostarda (ITCA) nas doses de 0, 60 e 120  $\mu\text{L.Kg}^{-1}$  de solo, ou com 1g/Kg do nematicida Terbufós (dose comercial, Counter 150 G). Essas amostras foram colocadas em sacos plásticos, vedadas e mantidas a temperatura de 25°C, permanecendo a metade das repetições por cinco dias e metade por dez. Decorrido o tempo, elas foram abertas e subdivididas em cinco subamostras de cem gramas para realização das análises microbiológicas. O delineamento foi inteiramente

cazualizado, no esquema fatorial (ITCA a 0, 60 e 120  $\mu\text{L.Kg}^{-1}$  e Terbufós 1g.Kg<sup>-1</sup> X 2 tempos de fumigação), com três repetições.

### **2.1. Análises microbiológicas**

As análises dos indicadores microbiológicos foram conduzidas no Laboratório de Análises Microbiológicas do Solo – LAMISOL, Departamento de Microbiologia – DMB, da Universidade Federal de Viçosa.

As análises de carbono da biomassa microbiana (CBM), respiração basal, atividade enzimática (fosfatase ácida, fosfatase básica,  $\beta$ -glicosidase e nitrificação potencial), análise da diversidade genética (extração de DNA total do solo, PCR, DGGE, microrganismos marcadores do DGGE, processamento das imagens dos géis de DGGE, análises de agrupamento) e a extração de nematóides do solo seguiram as mesmas metodologias relatadas no capítulo anterior.

## **3. Resultados**

O CBM, a atividade das enzimas e a respiração no solo não tratado com ITCA, foram maiores aos dez dias de incubação, ou não diferiu daquelas aos cinco dias (Tabela 1). O contrário foi verificado com qualquer dos tratamentos aplicados ao solo, isto é, quando houve diferença, a redução foi maior aos dez dias.

A biomassa dos microrganismos (CBM) foi reduzida pela aplicação dos nematicidas Terbufós e ITCA em comparação com a testemunha, e o efeito do tratamento tendeu a ser maior aos 10 dias. O Terbufós com cinco dias de tratamento reduziu 5,8% da CBM em relação à testemunha. Esse valor chegou a 47,8% aos dez dias. A redução do CBM resultante da aplicação de a 60  $\mu\text{L Kg}^{-1}$  de solo foi de 24,5% e 43,1%, aos cinco e dez dias de fumigação, respectivamente. Não houve diferença com a aplicação da dose de 120  $\mu\text{L Kg}^{-1}$

de solo nesse período, mas foi a menor quantidade de CBM obtida em relação aos demais tratamentos.

Em relação a nitrificação potencial, somente a dose 120  $\mu\text{L}$  do ITCA  $\text{Kg}^{-1}$  de solo causou mudança significativa, nos dois tempos de fumigação. A nitrificação potencial foi maior aos 10 dias no solo sem tratamento, não havendo efeito do tempo de fumigação nos solos que recebeu aplicação do Terbufós ou ITCA (tabela 1).

A dose de 120  $\mu\text{L}$  do ITCA  $\text{Kg}^{-1}$  de solo resultou na menor atividade da enzima fosfatase ácida, especialmente aos dez dias de fumigação, quando essa redução foi 48,7% em relação à testemunha. O tratamento do solo com Terbufós ou ITCA a 60  $\mu\text{L}$   $\text{Kg}^{-1}$  pouco afetou a atividade da enzima fosfatase básica, tanto aos cinco quanto aos dez dias. O tratamento com ITCA a 120  $\mu\text{L}$   $\text{Kg}^{-1}$  de solo resultou na redução significativa da atividade da fosfatase básica.

O uso da dose de 60  $\mu\text{L}$  do ITCA  $\text{Kg}^{-1}$  de solo equiparou-se ao nematicida convencional quanto ao efeito na atividade da enzima  $\beta$ -glicosidase, nos dois tempos de tratamento. O efeito desses dois tratamentos foi inferior ao tratamento com a dose de 120  $\mu\text{L}$  do ITCA  $\text{Kg}^{-1}$  de solo, na qual a redução de atividade da  $\beta$ -glicosidase foi de 85,77% e 24,81% em relação à testemunha aos cinco e dez dias de fumigação, respectivamente. A respiração basal do solo foi variável conforme os tratamentos ao longo do período, embora tenha havido tendência de redução da taxa respiratória quando se aplicou a maior dose do ITCA.

A dominância, diversidade e equitabilidade das bactérias no solo não foram afetadas pela aplicação do ITCA ou do nematicida (figura 1, tabela 2). O dendrograma do perfil de bandas da DGGE de bactérias presentes nos solos tratados ou não, resultou na formação de cinco clusters, com similaridade mínima de 96%. A aplicação de ITCA, independente da dose e do tempo de fumigação, causou aumento na intensidade de algumas bandas. Os tratamentos com Terbufós e ITCA (60 e 120  $\mu\text{L}$ ) com o tempo de 5 dias foram os mais distantes no dendrograma em relação aos demais tratamentos.

A aplicação de nematicida e ITCA, diferentemente da ação sobre as bactérias, afetou a comunidade de fungos no solo (figura 2, tabela 3). O dendrograma

constituído pelo perfil de bandas da DGGE de fungos resultou na formação de seis clusters, sendo que a menor similaridade encontrada foi a de 86% para o tratamento com terbufós, em relação aos demais tratamentos. O índice de dominância de Berger-Parker foi similar para todos os tratamentos aos cinco dias, mas o solo sem tratamento apresentou menor índice numérico do que os solos tratados aos dez dias. Observaram-se pequenas diferenças nos índices de Shannon-Wiener e Hill entre solos tratados e não tratados aos cinco e dez dias. A riqueza de espécies encontrada no solo não tratado diferiu daquela exibida pelos solos fumigados com o ITCA, cujos índices foram maiores que na testemunha, aos cinco dias.

Os nematóides recuperados pelo funil de Baermann foram separados em grupos tróficos, segundo seus hábitos alimentares. Somente nos solos não tratados foram recuperados nematoides. Obtiveram-se 34 ( $\pm 3$ ) nematóides bacteriófagos, 16 ( $\pm 2$ ) micófagos, 12 ( $\pm 1$ ) predadores de nematóides e 23 ( $\pm 4$ ) fitoparasitas, aos cinco dias. Aos dez dias, foram recuperados 15 ( $\pm 2$ ) bacteriófagos, 10 ( $\pm 1$ ) micófagos, 2 ( $\pm 1$ ) predadoras de nematóides e 15 ( $\pm 2$ ) fitoparasitas.

**Tabela 1** – Atividade enzimática, nitrificação, respiração e carbono da biomassa em solo tratado com isotiocianato de alila (ITCA em  $\mu\text{L Kg}^{-1}$ ) e o nematicida Terbufós ( $1\text{g.Kg}^{-1}$ ) durante cinco ou dez dias de tratamento.

TRATS.	CBM		Nitrificação		Fosfatase ácida		Fosfatase básica		$\beta$ -glicosidase		Respiração	
	tempo		tempo		tempo		tempo		tempo		tempo	
	5	10	5	10	5	10	5	10	5	10	5	10
TESTEMUNHA	93,5 Aa	70,2 Aa	1,6 Bb	2,1 Ba	570,8 Bb	665,7 Aa	310,9 Bb	662,4 Aa	268,6 Aa	39,9 Bb	62,8 Ba	64,6 Aa
Terbufós	88,0 Aa	36,6 Bb	2,2 Ba	1,9 Ba	567,4 Ba	523,4 Ba	738,6 Aa	538,1 Ab	110,9 Ba	58,8 Ab	70,0 ABa	56,7 ABb
ITCA 60 $\mu\text{L}$	70,6 Ba	39,9 Bb	1,4 Ba	1,4 Ba	718,3 Aa	712,5 Aa	844,9 Aa	651,2 Ab	141,7 Ba	57,6 Ab	82,6 Aa	50,2 Bb
ITCA 120 $\mu\text{L}$	29,9 Ca	25,8 Ba	4,1 Aa	4,1 Aa	451,0 Ca	341,6 Cb	357,5 Ba	282,0 Ba	38,2 Ca	30,0 Ca	51,0 Ca	46,2 Ba

Média de 3 repetições. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente pelo teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ). CBM-carbono da biomassa ( $\mu\text{g C Kg}^{-1}$  solo seco), fosfatase ácida, fosfatase básica e  $\beta$ -glicosidase ( $\mu\text{g p-nitrofenol.g}^{-1}$  solo.h<sup>-1</sup>), nitrificação ( $\mu\text{g NO}_3.\text{g}^{-1}$  solo.h<sup>-1</sup>) e respiração ( $\mu\text{Mol C-CO}_2.\text{Kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ).

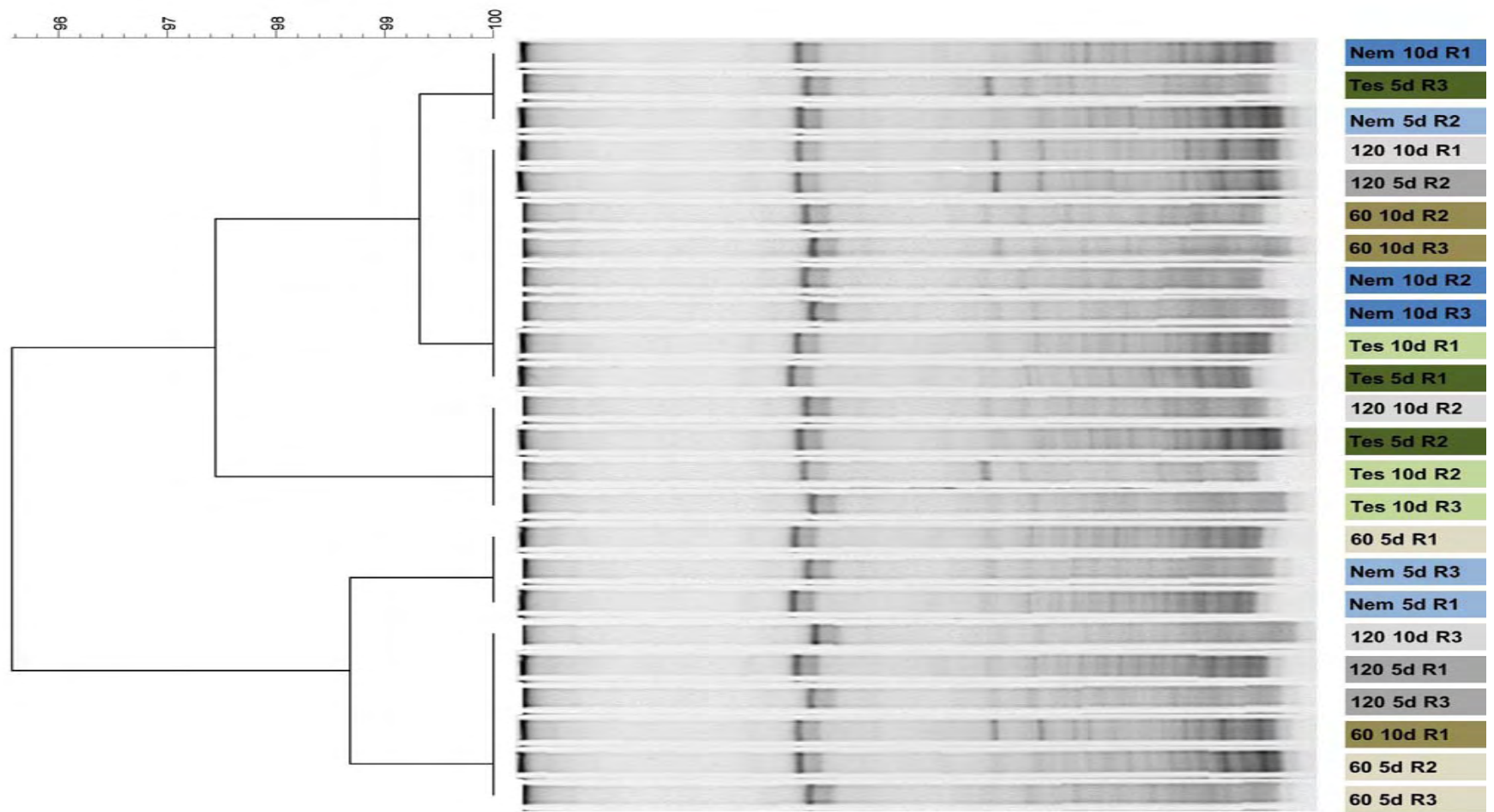


Figura 1- Dendrograma construído com os perfis de bandas do DGGE produzidas pela comunidade bacteriana em solo tratado com isotiocianato de alila (ITCA) e o nematicida Terbufós durante cinco ou dez dias de tratamento. As diferenças entre os perfis são indicadas pela porcentagem de similaridade, calculada pelo coeficiente de similaridade de Dirce e análise de agrupamento pelo método não ponderado de conjunto de pares por médias aritméticas (UPGMA). (Tes = Testemunha, 60 e 120 = Doses de ITCA, Nem = terbufós; 5d e 10d = dias de tratamento; R1, R2 e R3 = repetições).

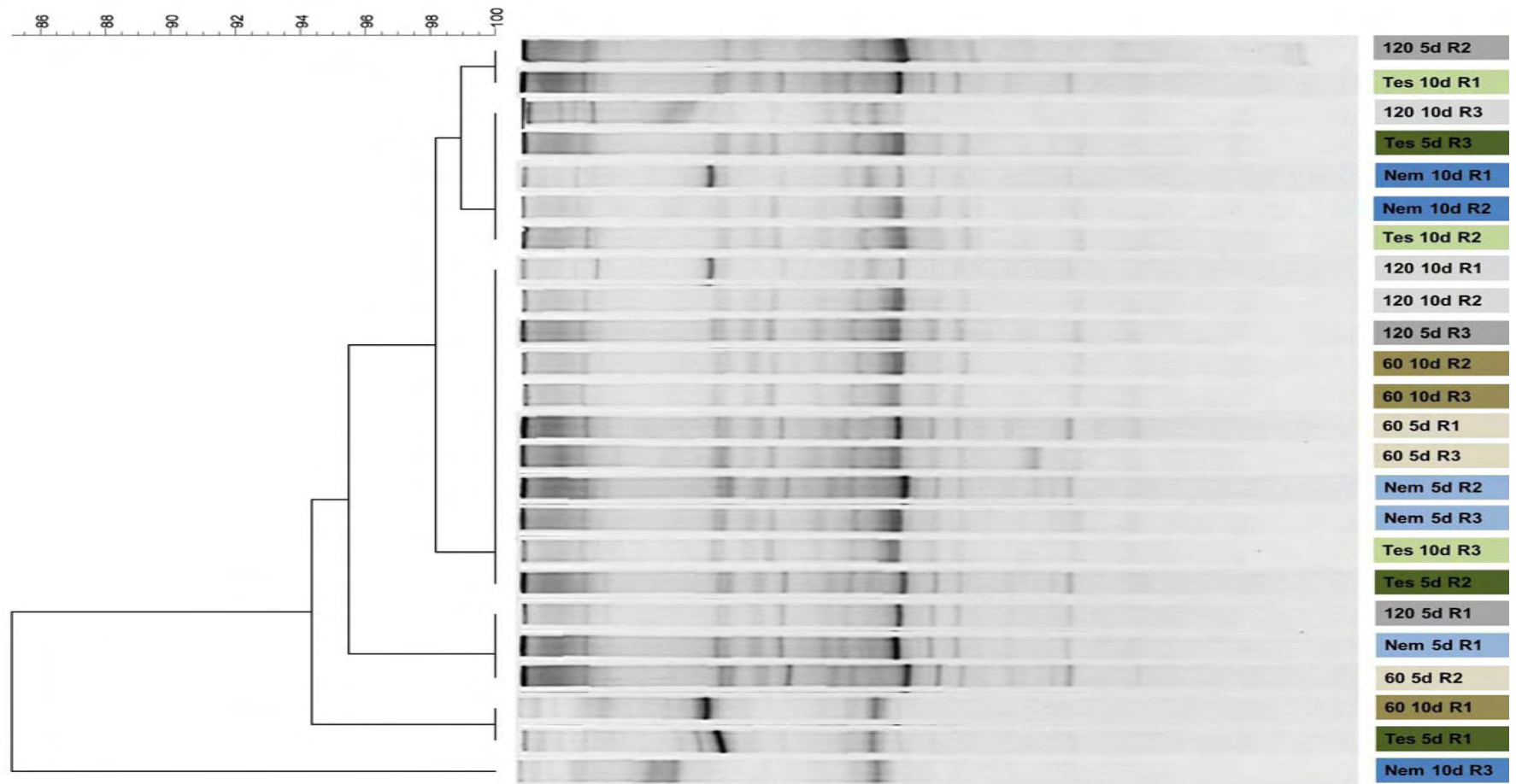


Figura 2- Dendrograma construído com os perfis de bandas do DGGE produzidas pela comunidade fúngica em solo tratado com isotiocianato de alila (ITCA) e o nematicida Terbufós durante cinco ou dez dias de tratamento. As diferenças entre os perfis são indicadas pela porcentagem de similaridade, calculada pelo coeficiente de similaridade de Dirce e análise de agrupamento pelo método não ponderado de conjunto de pares por médias aritméticas (UPGMA). (Tes = Testemunha, 60 e 120 = Doses de ITCA, Nem = terbufós; 5d e 10d = dias de tratamento; R1, R2 e R3 = repetições).

**Tabela 2** – índices de dominância, diversidade, equitabilidade e riqueza para a comunidade de bactérias em solo tratado com isotiocianato de alila (ITCA) e o nematicida Terbufós durante cinco ou dez dias de tratamento.

TRATS.	Dominância		Diversidade		Equitabilidade		Riqueza	
	Tempo		tempo		tempo		tempo	
	5	10	5	10	5	10	5	10
TESTEMUNHA	0,15Ba	0,16Ca	1,04Aa	1,05Aa	5,13Aa	5,07Aa	20Bb	24Aa
Terbufós	0,18Aa	0,18Ba	1,00Aa	1,05Aa	4,84Aa	4,96Aa	20Bb	24Aa
ITCA 60 µL	0,16Bb	0,20Aa	1,03Aa	1,01Aa	5,05Aa	4,73Ab	22Aa	22Aa
ITCA 120 µL	0,16Bb	0,18Ba	1,04A	1,03Aa	5,07Aa	4,79Ab	23Aa	24Aa

Média de 3 repetições. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente pelo teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Dominância (Berger-Parker), diversidade (Shanon-Wiever), equitabilidade (Hill) e riqueza (número de bandas no DGGE).

**Tabela 3** – índices de dominância, diversidade, equitabilidade e riqueza para a comunidade de fungos em solo tratado com isotiocianato de alila (ITCA) e o nematicida Terbufós durante cinco ou dez dias de tratamento.

TRATS.	Dominância		Diversidade		Equitabilidade		Riqueza	
	Tempo		tempo		tempo		tempo	
	5	10	5	10	5	10	5	10
TESTEMUNHA	0,33Aa	0,29Cb	0,81Ba	0,90Aa	3,46Ca	3,84Aa	11Cb	19Aa
Terbufós	0,27Bb	0,36Ba	0,87Aa	0,77Bb	4,08Aa	3,27Ab	16Ba	15Ba
ITCA 60 µL	0,26Bb	0,43Aa	0,82Ba	0,72Cb	3,89Ba	2,96Bb	15Ba	14Ba
ITCA 120 µL	0,31Aa	0,32Ba	0,88Aa	0,83Ba	3,70Ba	3,69Aa	18Aa	17Aa

Média de 3 repetições. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente pelo teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Dominância (Berger-Parker), diversidade (Shanon-Wiever), equitabilidade (Hill) e riqueza (número de bandas no DGGE).

#### 4. Discussão

O tempo de fumigação interferiu com os microrganismos e pode-se afirmar que com o tempo de tratamento de dez dias, o distúrbio foi maior. Nesse maior período há maior contato do ITCA com os microrganismos, causando assim as alterações que resultaram na redução da fosfatase ácida,  $\beta$ -glicosidase, na respiração e no CBM. No caso da nitrificação e da fosfatase ácida, o distúrbio se manteve até os dez dias. Os isotiocianatos, em contato com as células dos microrganismos penetram passivamente para seu interior (Zhang, 2004). Eles têm afinidade por regiões thiol, amino e hidroxil das proteínas, e a ligação do composto nestas regiões pode acarretar em inativação ou ativação, dependendo da proteína. As proteínas ativadas são as responsáveis pela destoxificação ou indução da apoptose da célula, as outras proteínas são geralmente inativadas (Thornalley, 2002). Nas enzimas avaliadas neste trabalho, a redução da atividade pode ser decorrente da sua inativação pelo ITCA, ou pela redução da quantidade de microrganismos. As enzimas são responsáveis por vários processos fundamentais na sobrevivência dos microrganismos e, conseqüentemente, na qualidade do solo. Estas são responsáveis, dentre outras coisas, pela degradação de moléculas orgânicas complexas em moléculas simples que podem ser assimiladas. As enzimas extracelulares são responsáveis pela decomposição e mineralização de nutrientes no solo, disponibilizando-os também para as plantas e promovendo assim a ciclagem de nutrientes no solo (Caldwell, 2005). Com a redução da atividade das enzimas fosfatase ácida, fosfatase básica e  $\beta$ -glicosidase pelo ITCA, a ciclagem de nutrientes pelos microrganismos ficou prejudicada.

As glicosidases podem ser encontradas em plantas, animais e microrganismos e catalisam reações de hidrólise de maltose e celobiose, cujos produtos são importantes fontes de energia para os microrganismos do solo (Caldwell, 2005). O ITCA e o nematicida Terbufós reduziram a atividade desta enzima, principalmente aos dez dias de tratamento. A redução da atividade da  $\beta$ -glicosidase reduz a obtenção de energia pelos microrganismos, e essa menor fonte de energia causa a redução da população dos mesmos. Isso é coerente com a redução do carbono da biomassa dos microrganismos nos

solos tratados. Já se sabe que a aplicação do fumigante brometo de metila reduz a atividade desta enzima em 70% (Ibekwe, 2004), e no caso do ITCA aplicado a  $120 \mu\text{L kg}^{-1}$  de solo se obteve 85% de redução, no tempo de fumigação de cinco dias. Aliás, a dose de  $120 \mu\text{L kg}^{-1}$  pode ser considerada prejudicial para a comunidade microbiana do solo, uma vez que seu efeito sobre as variáveis avaliadas, CBM, nitrificação, as fosfatases e  $\beta$ -glicosidase foi sempre de redução nos teores das enzimas.

As fosfatases são fundamentais na mineralização do fósforo e, conseqüentemente, na ciclagem deste nutriente no ambiente. A redução da atividade destas enzimas não afeta somente a população de microrganismos, mas, também a disponibilidade de fósforo para as plantas, visto que a enzima catalisa a hidrólise de fósforo orgânico ao fósforo inorgânico, forma que é assimilada pelas plantas (Caldwell, 2005). Outros fumigantes como a cloropicrina, o 1,3-dicloropropano, iodometano e metil-isitiocianato, causaram redução na atividade das enzimas desidrogenase, fosfatase ácida, arilsulfatase e  $\beta$ -glicosidase, mas comparando com o uso do brometo de metila, a atividade destas enzimas foi maior na primeira semana após a aplicação (Klose e Ajwa, 2004; Klose, Acosta-Martinez *et al.*, 2006). Acredita-se que no caso de substâncias originadas de plantas com eficiência no controle de fitopatógenos, elas também provoquem essas alterações na atividade de tais enzimas presentes nos microrganismos do solo. Alguns estudos indicam que estas interferências são menores quando comparadas com as provocadas por produtos fumigantes sintéticos, pois normalmente aqueles compostos são incorporados ao solo com partes das plantas (tortas ou extratos vegetais), fornecendo nutrientes para a microbiota do solo responder ao distúrbio causado, restabelecendo sua condição natural mais rapidamente (Gopal, Gupta *et al.*, 2007; Spyrou, Karpouzas *et al.*, 2009).

No tratamento com  $120 \mu\text{L.kg}^{-1}$  de ITCA, a respiração basal do solo reduziu proporcionalmente ao valor do carbono da biomassa. Na dose de  $60 \mu\text{L}$  de ITCA, o valor da respiração foi maior do que na testemunha, mas o carbono da biomassa menor e esta elevação na respiração podem ter sido ocasionados por morte parcial das populações. Essa biomassa morta pode fornecer

nutrientes, carbono e energia para as células sobreviventes, o que resulta em aumento da respiração.

A nitrificação potencial do solo foi aumentada de forma significativa na dose de 120 µL de ITCA, enquanto outros tratamentos foram similares à testemunha. Nessa dose de ITCA, provavelmente o desequilíbrio nas populações de bactérias favoreceu o aumento da população de bactérias nitrificantes, visto que as populações tendem a ficar em equilíbrio no solo. Assim, quando ocorre redução de algumas populações, outras populações tendem a aumentar. O sinergismo dos isotiocianatos 2-propenil (= alila – ITCA) e dimethyl-sulphide resultaram no atraso do processo de desnitrificação (Bending e Lincoln, 2000), em virtude da capacidade desses ITCA's se ligarem às proteínas, alterando sua estrutura e funcionalidade (Amlinger, Gotz *et al.*, 2003; Brown e Morra, 2009).

O mecanismo de defesa da célula contra o isotiocianato, conhecido até o momento, envolve a enzima glutathione S-transferase (Vanhaelen, Haubruge *et al.*, 2001). Esta enzima está localizada no citosol da célula. Quando o isotiocianato vai para o meio intracelular, ocorre ligação entre a enzima glutathione e o isotiocianato, o que resulta na inativação do composto, que é transportado para o exterior da célula. A composição da enzima glutathione-S-transferase é composta pelos aminoácidos: ácido glutâmico, cisteína e glicina. O aminoácido cisteína possui o radical SH (tiol), onde ocorrerá a ligação com o isotiocianato. Em eucariotos, o mecanismo de defesa é a destoxificação, expulsando o ITCA para fora da célula; presume-se que, em procarioto o mecanismo deve ser semelhante. Assim como o tempo de fumigação utilizado neste estudo, o mecanismo de destoxificação não foi eficiente, pois as alterações na fisiologia dos microrganismos foi evidenciada pela redução da atividade da fosfatase ácida, fosfatase básica e a β-glicosidase.

No geral, a utilização do nematicida químico (Terbufós) e do ITCA não alterou a estrutura da comunidade bacteriana do solo. Isso pode ser constatado pela similaridade dos fingerprint de rDNA 16S e dos índices de diversidade, riqueza, dominância e equitabilidade estimados a partir da quantificação das bandas do DGGE. As bactérias têm mecanismo de proteção eficiente contra condições adversas e compostos xenobióticos, além de serem de tamanho

reduzido, colonizando pequenos poros do solo, o que lhes confere certa proteção. Os fungos, por sua vez, apresentaram maior vulnerabilidade aos compostos avaliados. Os tratamentos com ITCA e o Terbufós modificaram a estrutura da comunidade de fungos. O fingerprint da comunidade apresentou a maior quantidade de bandas nos tratamentos com ITCA e Terbufós, mas todos os tratamentos apresentaram alta similariedade entre si ( $\geq 84\%$ ). O aumento do número de bandas do tratamento com ITCA na maior dose, independente do tempo de fumigação, resultou na redução de algumas populações dominantes no solo, favorecendo o rápido crescimento das populações menos sensíveis, que estavam em baixo número.

Poucas informações sobre alterações na comunidade microbiana proporcionada pela incorporação de plantas de *Brassica* spp. ao solo são conhecidas. O patógeno de solo *Rhizoctonia solani* teve sua população reduzida pela ação dos isotiocianatos de brássicas e pelo incremento de microorganismos antagonistas presentes no solo (Cohen, Yamasaki *et al.*, 2005). Antagonistas residentes naturalmente no solo, como *Streptomyces* spp. e *Pseudomonas* spp., apresentaram incrementos em sua população após a incorporação de *Brassica napus* (Cohen, Yamasaki *et al.*, 2005; Brown e Morra, 2009; Oliveira, Dhingra *et al.*, 2011). Assim como ocorra com a incorporação de brássicas ao solo outros fumigantes como a cloropicrina, a população de bactérias gram negativas diminuiu após 8 dias da aplicação (Yamamoto, Ultra *et al.*, 2008). Aplicação de metam sódio ao solo gerou um aumento no perfil de ácidos graxos de bactérias gram positivas e actinomicetes, mas redução na população bactérias gram negativas (Macalady, Fuller *et al.*, 1998). Wang, Liu *et al.* (2008), trabalhando com aplicação de metamidofós na dose de 23,8 mg kg<sup>-1</sup> de solo, observou redução de 80% na população de fungos cultiváveis.

O ITCA e o Terbufós inativaram ou mataram os nematóides presentes no solo, independentemente do nível trófico do nematóide, visto que não foi recuperado nenhum nematóides nos tratamentos que recebera aplicação desses compostos, nos dois tempos de fumigação. Estudos com a aplicação de ITCA no substrato de produção de mudas nas mesmas doses inativaram os

ovos de *Meloidogyne exigua* (Aguiar, 2008) e nematóides de vida livre também foram sensíveis ao ITCA (Henderson, Riga *et al.*, 2009).

## 5. Conclusões

O isotiocianato de alila e terbufós interferiu na atividade metabólica dos microrganismos do solo.

Com o tempo de fumigação de dez dias, a redução da atividade das enzimas fosfatase ácida, fosfatase básica e  $\beta$ -glicosidase, carbono da biomassa e respiração basal foi maior na dose de ITCA mais elevada ( $120 \mu\text{L kg}^{-1}$ ), portanto, houve redução na densidade de microrganismos no solo tratado.

Pelas análises de fingerprint e os índices de riqueza, diversidade, equitabilidade e dominância, as comunidades bacterianas e fúngicas do solo ocorre distúrbio na comunidade microbiana pelos nematicidas terbufós e ITCA.

Conforme esperado, a comunidade de nematóides no solo foi reduzida drasticamente com a aplicação do ITCA e do nematicida.

A fumigação com cinco dias na dose de  $60 \mu\text{L kg}^{-1}$  de ITCA é eficiente para controlar os fitonematóides, e causa menor impacto na comunidade microbiana do solo.

## 6. Referencias Bibliográficas

AGUIAR, N. D. C. **Tecnologia de uso da torta e do óleo essencial de mostarda no controle de *Meloidogyne exigua***. 2008. 65 (Mestrado em Fitopatologia). Fitopatologia, Dissertação de Mestrado em Fitopatologia. UFV/Viçosa

AKHTAR, M.; ALAM, M. M. Utilization of Waste Materials in Nematode Control - a Review. **Bioresource Technology**, v. 45, n. 1, p. 1-7, 1993.

AMLINGER, F. Nitrogen in biowaste and yard waste compost: dynamics of mobilisation and availability - a review. **European Journal of Soil Biology**, v. 39, n. 3, p. 107-116, 2003.

BENDING, G. D.; LINCOLN, S. D. Inhibition of soil nitrifying bacteria communities and their activities by glucosinolate hydrolysis products. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 32, n. 8-9, p. 1261-1269, 2000.

BRIDGE, J. Nematode management in sustainable and subsistence agriculture. **Annual Review of Phytopathology**, v. 34, p. 201-225, 1996.

BROWN, P. D.; MORRA, M. J. Control of soil-borne plant pests using glucosinolate-containing plants. **Advances in Agronomy**, v. 61, p. 167-231, 1997.

\_\_\_\_\_. Brassicaceae Tissues as Inhibitors of Nitrification in Soil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 17, p. 7706-7711, 2009.

CALDWELL, B. A. Enzyme activities as a component of soil biodiversity: A review. **Pedobiologia**, v. 49, n. 6, p. 637-644, 2005.

CASTRO, D. B. **Uso do óleo essencial de mostarda no controle de *Meloidogyne enterolobii* (= *M. mayaguensis*) em pomar de goiabeira**. 2010.

53 (Mestrado em Fitopatologia). Fitopatologia, Dissertação de Mestrado em Fitopatologia. UFV/Viçosa

CHEN, Y. R. Phenylethyl isothiocyanate induces apoptotic signaling via suppressing phosphatase activity against c-Jun N-terminal kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 42, p. 39334-39342, 2002.

COHEN, M. F.; YAMASAKI, H.; MAZZOLA, M. *Brassica napus* seed meal soil amendment modifies microbial community structure, nitric oxide production and incidence of Rhizoctonia root rot. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 37, n. 7, p. 1215-1227, 2005.

DAYAN, F. E.; CANTRELL, C. L.; DUKE, S. O. Natural products in crop protection. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 12, p. 4022-4034, 2009.

DROBNICA, L. et al. Antifungal activity of isothiocyanates and related compounds .I. Naturally occurring isothiocyanates and their analogues. **Applied Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 701-&, 1967.

FERRAZ, S.; FREITAS, L. G. Use of Plants and Natural Products. In: CHEN, Z. X.; CHEN, S. Y., *et al* (Ed.). **Nematology: Advances and Perspectives. Nematode Management and Utilization**, v.2, 2004. p.931-977.

GOPAL, M. et al. Impact of azadirachtin, an insecticidal allelochemical from neem on soil microflora, enzyme and respiratory activities. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 16, p. 3154-3158, 2007.

GOULART, R. R. **Biofumigação com *Brassica rapa* para o controle de *Meloidogyne exigua* em diferentes texturas e umidades do solo**. 2007. 52 (Mestrado em Fitopatologia). Fitopatologia, Dissertação de Mestrado em Fitopatologia. UFV/Viçosa

HENDERSON, D. R. et al. Mustard Biofumigation Disrupts Biological Control by *Steinernema* spp. Nematodes in the Soil. **Journal of Nematology**, v. 41, n. 4, p. 337-337, 2009.

HOSHINO, Y. T.; MATSUMOTO, N. Changes in fungal community structure in bulk soil and spinach rhizosphere soil after chemical fumigation as revealed by 18S rDNA PCR-DGGE. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 53, n. 1, p. 40-55, 2007.

IBEKWE, A. M. Effects of fumigants on non-target organisms in soils. **Advances in Agronomy, Vol 83**, v. 83, p. 1-35, 2004.

IBEKWE, A. M. et al. Impact of fumigants on soil microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 3245-3257, 2001.

KIRKEGAARD, J. A.; SARWAR, M. Biofumigation potential of brassicas I. Variation in glucosinolate profiles of diverse field-grown brassicas. **Plant and Soil**, v. 201, p. 71–89, 1998.

KLOSE, S.; ACOSTA-MARTINEZ, V.; AJWA, H. A. Microbial community composition and enzyme activities in a sandy loam soil after fumigation with methyl bromide or alternative biocides. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 38, n. 6, p. 1243-1254, 2006.

KLOSE, S.; AJWA, H. A. Enzyme activities in agricultural soils fumigated with methyl bromide alternatives. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 36, n. 10, p. 1625-1635, 2004.

LIMA, A. O. **Uso da Mostarda (*Brassica rapa*) como biofumigante de solo no controle de *Meloidogyne incognita***. 2006. 55 (Mestrado em Fitopatologia). Fitopatologia, Dissertação de Mestrado em Fitopatologia. UFV/Viçosa

MACALADY, J. L.; FULLER, M. E.; SCOW, K. M. Effects of metam sodium fumigation on soil microbial activity and community structure. **Journal of Environmental Quality**, v. 27, n. 1, p. 54-63, 1998.

MOJTAHEDI, H. et al. Managing *Meloidogyne chitwoodi* on Potato with Rapeseed as Green Manure. **Plant Disease**, v. 77, n. 1, p. 42-46, 1993.

OLIVEIRA, R. D. L. et al. Glucosinolate content and nematicidal activity of Brazilian wild mustard tissues against *Meloidogyne incognita* in tomato. **Plant and Soil**, v. 341, n. 1-2, p. 155-164, 2011.

POTTER, M. J.; DAVIES, K.; RATHJEN, A. J. Suppressive impact of glucosinolates in Brassica vegetative tissues on root lesion nematode *Pratylenchus neglectus*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 24, n. 1, p. 67-80, 1998.

SPYROU, I. M.; KARPOUZAS, D. G.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U. Do Botanical Pesticides Alter the Structure of the Soil Microbial Community? **Microbial Ecology**, v. 58, n. 4, p. 715-727, 2009.

THORNALLEY, P. J. Isothiocyanates: mechanism of cancer chemopreventive action. **Anti-Cancer Drugs**, v. 13, n. 4, p. 331-338, 2002.

VANHAELEN, N. et al. Hoverfly glutathione S-transferases and effect of Brassicaceae secondary metabolites. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 71, n. 3, p. 170-177, 2001.

VIG, A. P. et al. Bio-protective effects of glucosinolates - A review. **Lwt-Food Science and Technology**, v. 42, n. 10, p. 1561-1572, 2009.

WANG, M. C. et al. Impacts of methamidophos on the biochemical, catabolic, and genetic characteristics of soil microbial communities. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, n. 3, p. 778-788, 2008.

YAMAMOTO, T. et al. Effects of methyl bromide fumigation, chloropicrin fumigation and steam sterilization on soil nitrogen dynamics and microbial properties in a pot culture experiment. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 54, n. 6, p. 886-894, 2008.

ZASADA, I. A.; FERRIS, H. Sensitivity of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans* to isothiocyanates in laboratory assays. **Phytopathology**, v. 93, n. 6, p. 747-750, 2003.

ZHANG, Y. S. Cancer-preventive isothiocyanates: measurement of human exposure and mechanism of action. **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 555, n. 1-2, p. 173-190, 2004.

## Capítulo 3 - Recuperação da atividade microbiana no solo após tratamento com isotiocianato de alila

### 1. Introdução

Os fumigantes são usados no controle de fitopatógenos do solo desde 1869, com a aplicação do bissulfeto de carbono (Capinera, 2008). O brometo de metila, o mais usado dos fumigantes, está com sua comercialização proibida em vários países (Unep, 1998), inclusive no Brasil. Não existe no mercado nenhum produto que possa substituí-lo com a mesma eficácia, e estudos sobre novas alternativas estão em desenvolvimento. Incorporação de partes de plantas ou compostos bioativos derivados dessas plantas podem ser utilizados como biopesticidas (Akhtar e Alam, 1993).

Diversas plantas são conhecidas por apresentarem substâncias com efeito nematicida e, ou nematostático (Ferraz e Freitas, 2004). Dentre essas, merecem destaque as plantas da família Brassicaceae, devido às potencialidades de seu uso no controle de fungos, bactérias e nematóides habitantes de solo (Drobnica, Zemanova *et al.*, 1967; Brown e Morra, 1997; Chen, Han *et al.*, 2002; Dayan, Cantrell *et al.*, 2009; Vig, Rampal *et al.*, 2009; Oliveira, Dhingra *et al.*, 2011). Estudos sobre o impacto da incorporação de partes ou de planta inteira de brássicas na comunidade microbiana do solo mostraram que os isotiocianatos (ITCs) causam baixo impacto, em regiões de clima temperado (Cohen, Yamasaki *et al.*, 2005; Henderson, Riga *et al.*, 2009; Mazzola e Zhao, 2010; Omirou, Rousidou *et al.*, 2011; Wang, Hu *et al.*, 2012).

O efeito dos ITCs, principalmente do isotiocianato de alila (ITCA) proveniente do óleo essencial de mostarda (OEM), vem sendo avaliado nessa última década sobre diferentes fitopatógenos, como fungos (Dhingra, Costa *et al.*, 2004; Schurt, 2006), bactérias (Pontes, 2009) e nematóides (Lima, 2006; Aguiar, 2008).

Mortalidade em mais de 90% dos juvenis de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. enterolobii* e *Heterodera glycines* foi obtida em laboratório, e estudos em condições controladas revelaram 95% de redução na reprodução de *M. exigua* em cafeeiro, quando se usou o óleo essencial de mostarda, que

contém 95% de ITCA (Lima, 2006; Goulart, 2007; Aguiar, 2008). Pesquisas a campo estão ainda em fase inicial (Castro, 2010).

Acredita-se que haja algum impacto do ITCA sobre os microrganismos do solo, principalmente nas condições tropicais, mas o que se desconhece é se a comunidade microbiana pode se restabelecer após a sua aplicação e quanto tempo a mesma leva para se recompor, após a aplicação. O objetivo deste trabalho foi estudar se há recuperação da comunidade microbiana no solo após a aplicação do ITCA.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Aplicação do ITCA e Terbufós.**

O isotiocianato de alila (ITCA) usado nos ensaios é oriundo do óleo essencial de mostarda (OEM – 95%), obtido de empresas alimentícias.

Amostras de três quilos de solo das texturas argilosa, média e arenosa foram tratadas com (ITCA) nas doses de 0 e 120  $\mu\text{L.Kg}^{-1}$  de solo, e Terbufós (Terbufós 150 G) a 1g. $\text{Kg}^{-1}$  solo. Após o tratamento, o solo foi colocado em saco plástico vedado e acomodado em câmara de crescimento com temperatura controlada de 25 °C, permanecendo nesta condição por dez dias. Decorrido este período, os sacos foram abertos e o solo dividido em cinco porções colocadas em vasos plásticos de 1 litro (um vaso para cada tempo de avaliação), permanecendo na temperatura citada anteriormente e estes eram umedecidos periodicamente. As avaliações microbiológicas foram feitas em intervalos de sete dias contados a partir do dia “zero” da abertura do saco plástico, totalizando cinco avaliações. O experimento foi montado no delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial, com três repetições.

## 2.2. Análises microbiológicas

As análises dos indicadores microbiológicos foram conduzidas no Laboratório de Análises Microbiológicas do Solo – LAMISOL, Departamento de Microbiologia – DMB, da Universidade Federal de Viçosa.

As análises de Carbono da biomassa microbiana (CBM), Respiração basal, Atividade enzimática (Fosfatase ácida, Fosfatase básica,  $\beta$ -glicosidase e Nitrificação potencial), Análise da diversidade genética (Extração de DNA total do solo, PCR, Microrganismos marcadores do DGGE (Eletroforese em gel com gradiente desnaturante), Processamento das imagens dos géis de DGGE, e as análises de agrupamento foram realizadas como relatado no capítulo 1.

## 3. Resultados

Houve diferença no teor de carbono da biomassa dos microrganismos (CBM) entre as três texturas, o qual decresceu a medida que se aumentou a quantidade de areia no solo (Figura 1). O solo não-tratado exibiu tendência do carbono da biomassa dos microrganismos ser mais elevada durante as quatro semanas (Figura 1), exceto no solo arenoso, em que o CBM não diferiu do tratamento com ITCA ou Terbufós.

A respiração basal foi mais elevada no solo argiloso, mas em todos os solos houve redução na taxa respiratória ao longo do tempo, especialmente quando se compara o dia zero e o 28<sup>o</sup> (figura 2). De forma geral, o tratamento do solo com ITCA reduziu mais a respiração basal que os demais tratamentos nos solos estudados.

Nas três texturas, o solo não-tratado exibiu a tendência da atividade da enzima  $\beta$ -glicosidase ser mais elevada durante as quatro semanas (Figura 3), mas a curva de atividade da enzima foi semelhante entre os tratamentos. Mais uma vez, os níveis da  $\beta$ -glicosidase foram mais elevados no solo argiloso, variando de 60 a 80  $\mu\text{g p-nitrophenol.g}^{-1} \text{ solo.h}^{-1}$  aos 28 dias. Esses níveis nos solos arenoso e de textura média foram menores em pelo menos 50%.

A atividade da enzima fosfatase ácida nos solos tratados com o nematicida Terbufós e ITCA foi crescente e similar ao solo não-tratado, até os 28 dias, exceto no solo de textura média, no qual a testemunha apresentou

alguma redução de atividade (figura 4). No solo arenoso, a atividade da enzima foi a mais baixa, e menos que a metade da atividade no solo de textura média e três vezes menor que no de textura argilosa.

Nas três texturas, o solo não-tratado e os tratados com Terbufós ou ITCA, exibiram tendência similar para a atividade da fosfatase básica (figura 5). Essa atividade foi baixa nos solos arenoso e de textura média (em torno de 10 a 20  $\mu\text{g p-nitophenol.g}^{-1} \text{ solo.h}^{-1}$ ), mas foi crescente no solo argiloso ao longo do tempo atingindo valores de 220  $\mu\text{g p-nitophenol.g}^{-1} \text{ solo.h}^{-1}$ .

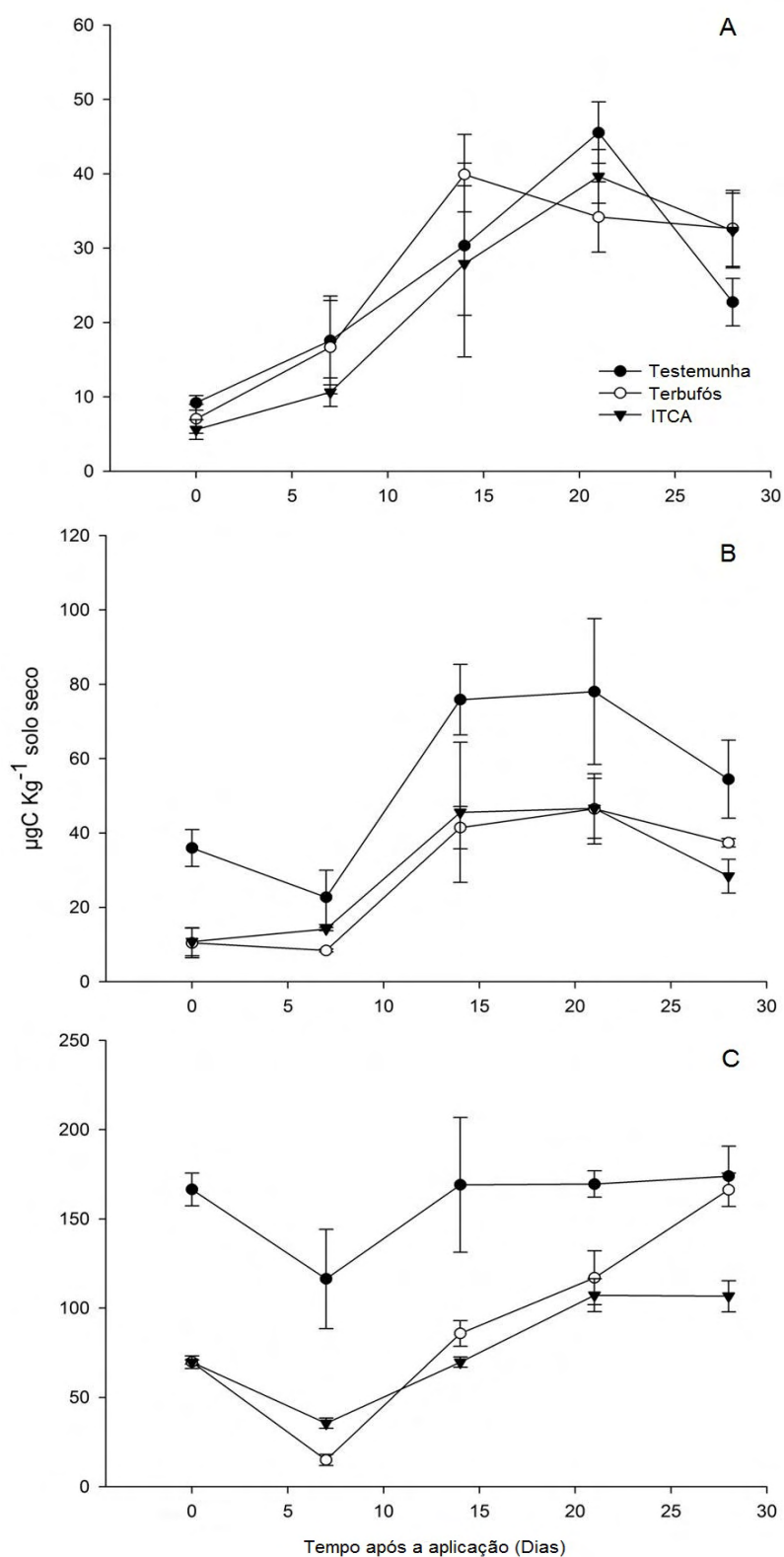


Figura 1- Carbono da biomassa dos microrganismos presente nos solos de textura arenosa (A), média (B) e argilosa (C), tratados com isotiocianato de alila (ITCA) ou Terbufós ou não tratado (testemunha), ao longo de quatro semanas após tratamento.

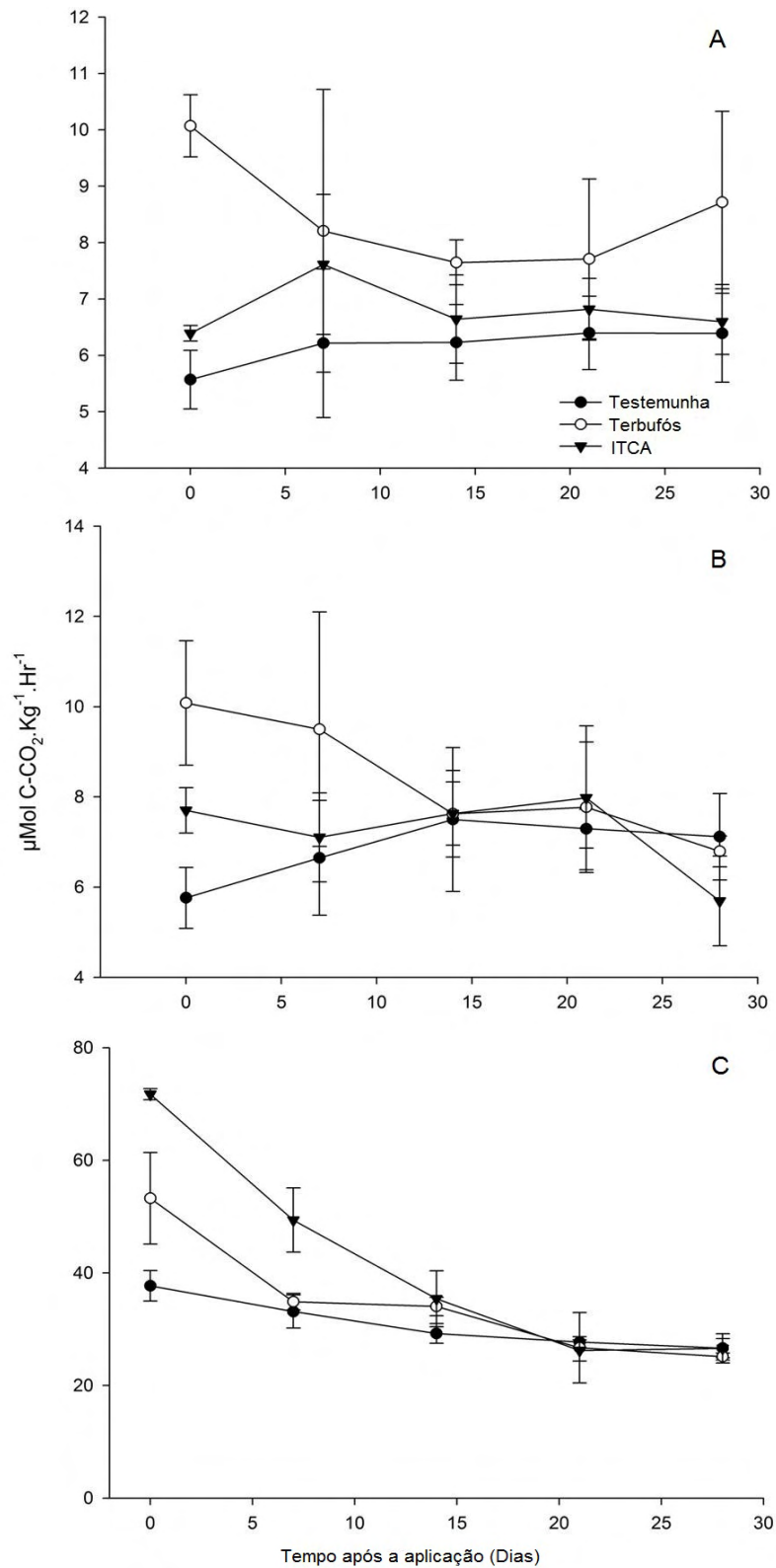


Figura 2 - Respiração basal dos microrganismos presente nos solos de textura arenosa (A), média (B) e argilosa (C), tratados com isotiocianato de alila (ITCA) ou Terbufós ou não tratado (testemunha), ao longo de quatro semanas após tratamento.

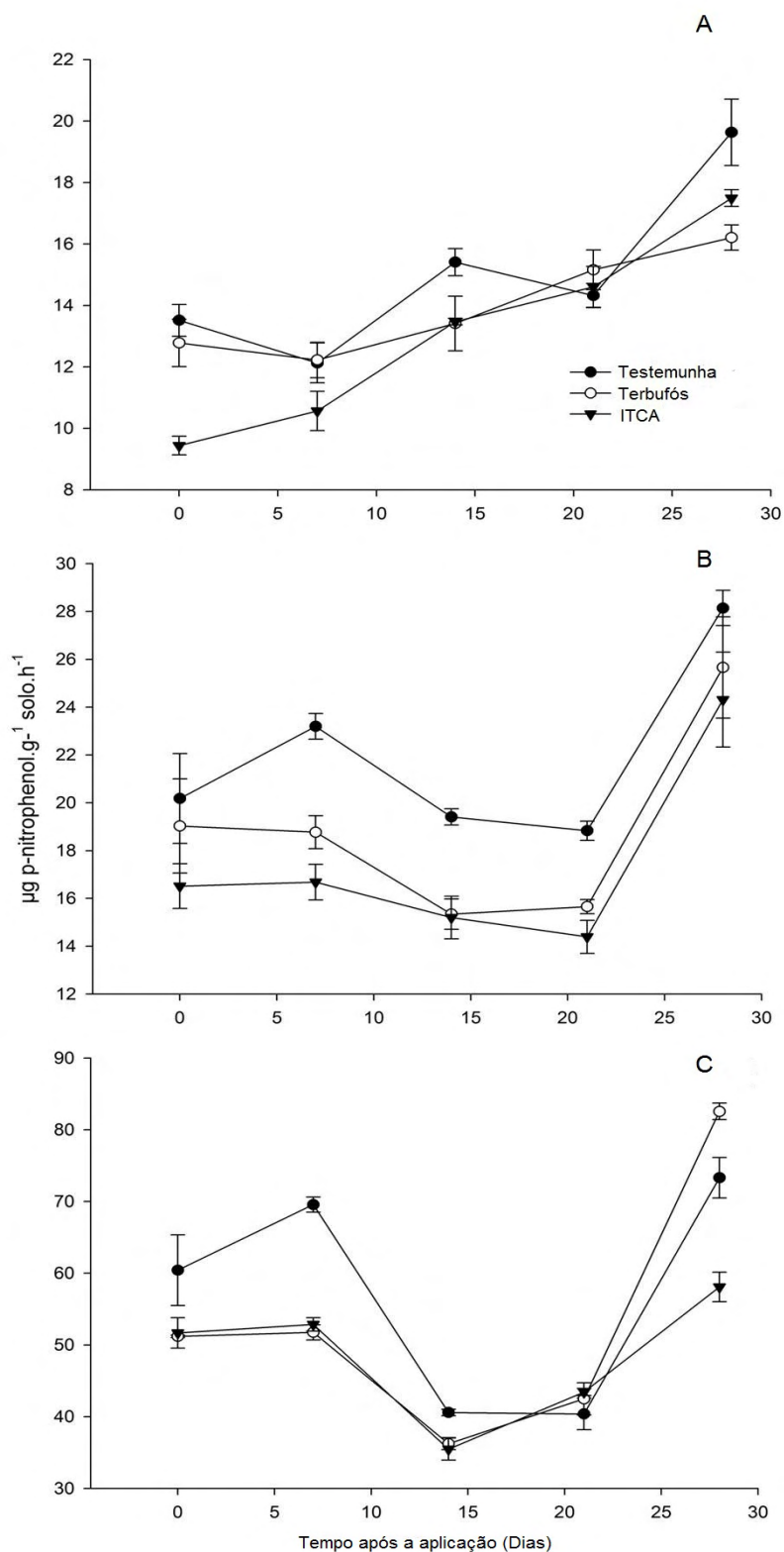


Figura 3 - Atividade da atividade da enzima  $\beta$ -glicosidade em solos de textura arenosa (A), média (B) e argilosa (C), tratados com isotiocianato de alila (ITCA) ou Terbufós ou não tratado (testemunha), ao longo de quatro semanas após tratamento.

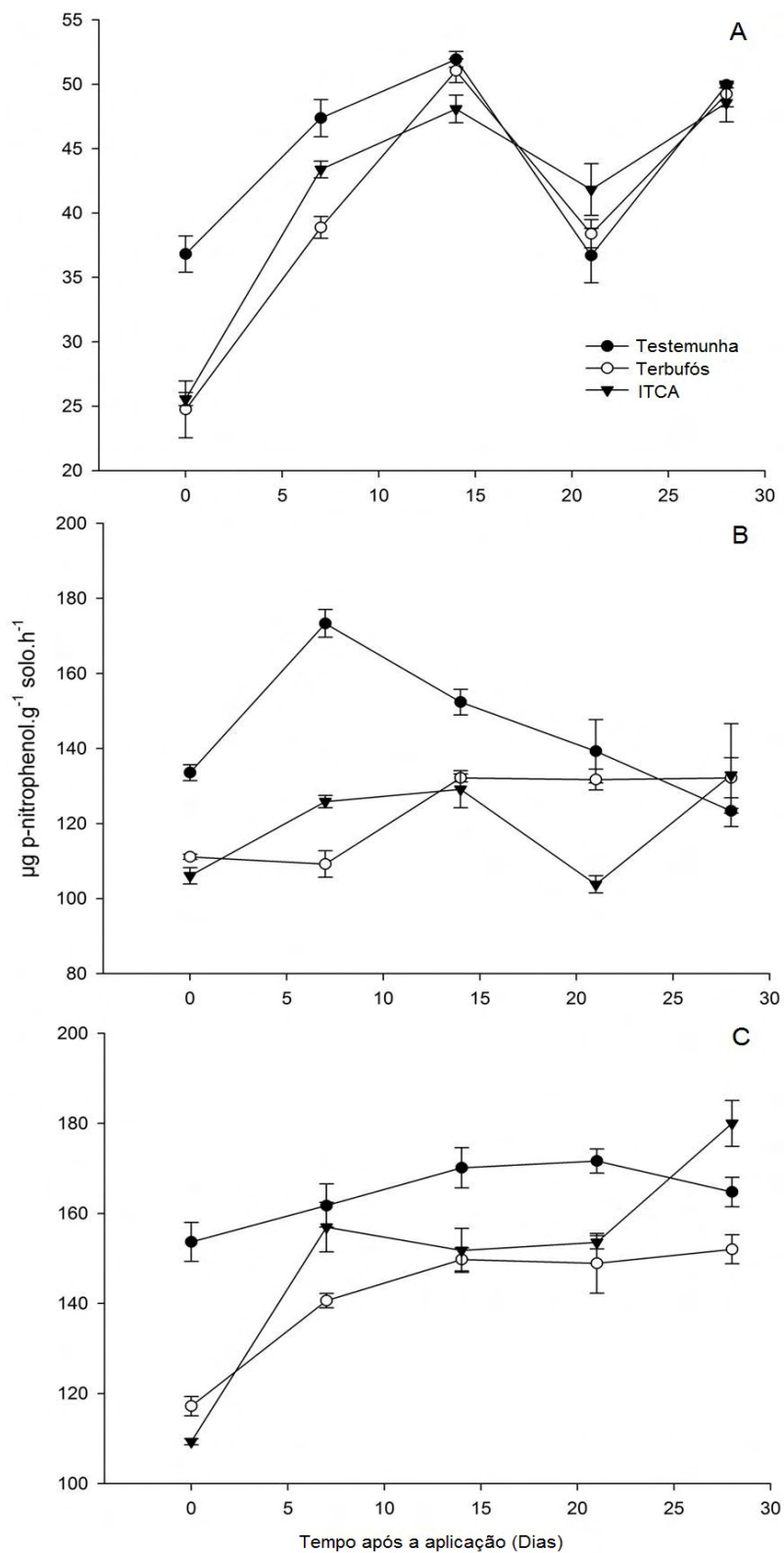


Figura 4- Atividade da enzima fosfatase ácida em solos de textura arenosa (A), média (B) e argilosa (C), tratados com isotiocianato de alila (ITCA) ou Terbufós ou não tratado (testemunha), ao longo de quatro semanas após tratamento.

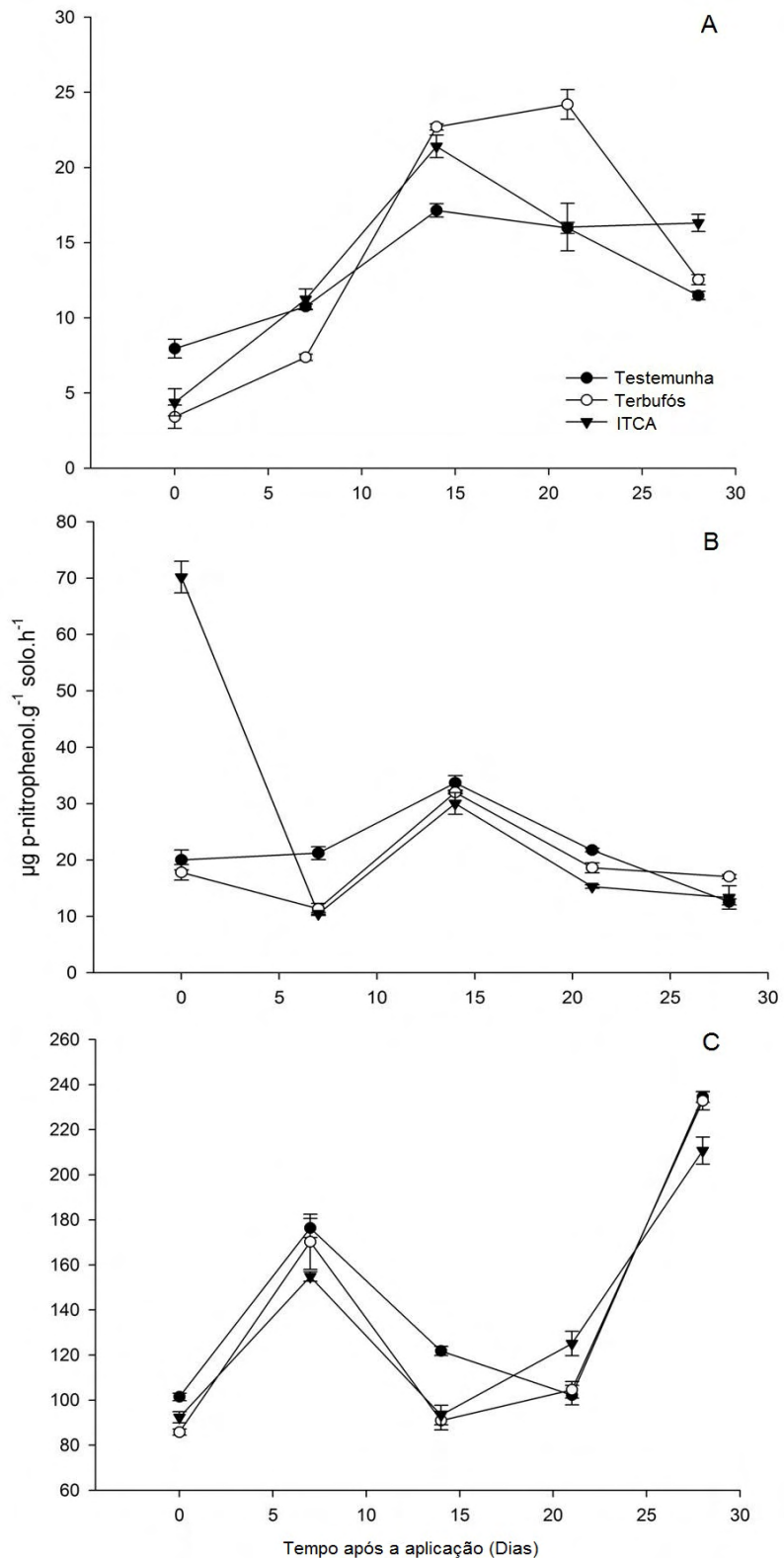


Figura 5- Atividade da enzima fosfatase básica em solos de textura arenosa (A), média (B) e argilosa (C), tratados com isotiocianato de alila (ITCA) ou Terbufós ou não tratado (testemunha), ao longo de quatro semanas após tratamento.

No solo de textura arenosa, o tratamento com ITCA causou pequeno aumento na taxa de nitrificação e o Terbufós não a afetou (figura 6A). No solo de textura média, a tendência da taxa de nitrificação potencial do solo foi semelhante entre os tratamentos, e se manteve nas quatro semanas (figura 6B). No solo de textura argilosa, observou-se aumento na taxa de nitrificação potencial para todos os tratamentos aos 28 dias, embora houvesse decréscimo da taxa no meio do período (por volta do 14 dias). A testemunha e o Terbufós exibiram as mais altas taxas de nitrificação (figura 6C).

No início do tratamento, o fingerprint da comunidade de fungos presentes no solo de textura média tratado com ITCA ou Terbufós, exibiu 80% de similaridade com a testemunha (figura 7). No solo de textura arenosa, o fingerprint nos tratamentos com ITCA e terbufós apresentaram 75% e 85% de similaridade com o da testemunha, respectivamente. No solo de textura argilosa, o fingerprint dos tratamentos com ITCA e nematicida apresentou similaridade maior ou superior a 90% em relação a testemunha.

Aos sete dias após a fumigação, os fingerprints da comunidade de fungos nos solos de textura argilosa e média, tratados com ITCA, apresentaram similaridade de 63% com a testemunha, quase igual a similaridade entre a testemunha e o solo tratado com o Terbufós, que foi de 70% (Figura 8). No solo de textura arenosa, a similaridade entre os fingerprints das comunidades de fungos nos solos tratados com ITCA ou Terbufós e a testemunha foi de 50% e 60%, respectivamente.

Aos 14 dias após a fumigação, o fingerprint da comunidade de fungos no solo de textura argilosa tratado com ITCA apresentou 80% de similaridade com a testemunha e o tratado com Terbufós apresentou 73% de similaridade (figura 9). No solo de textura média os tratamentos com ITCA e Terbufós apresentou similaridade com a testemunha de 90% e no solo de textura arenosa o tratamento com ITCA apresentou 80% de similaridade com a testemunha e o tratado com Terbufós 95% de similaridade.

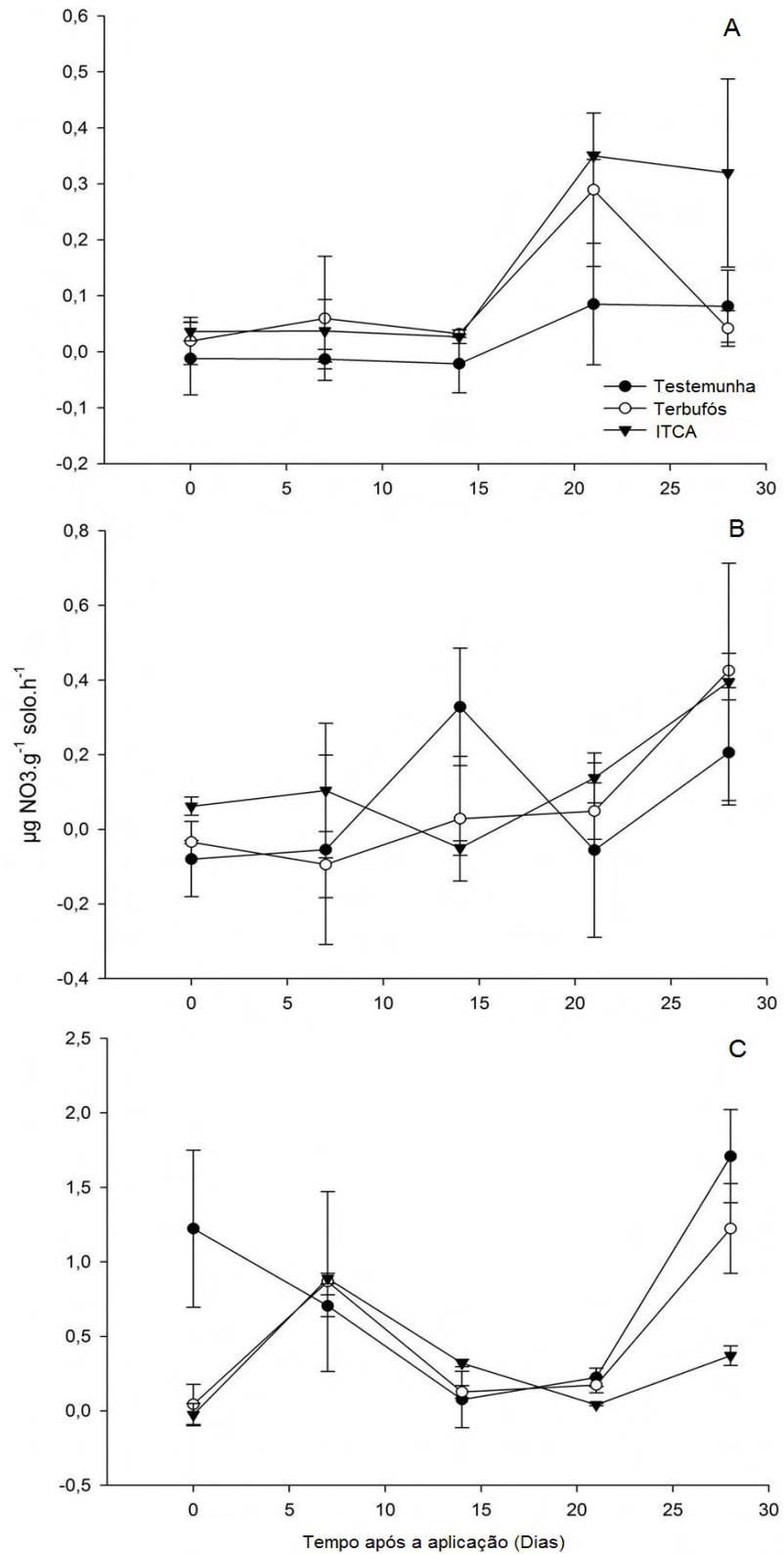


Figura 6- Atividade da nitrificação potencial em solos de textura arenosa (A), média (B) e argilosa (C), tratados com isotiocianato de alila (ITCA) ou Terbufós ou não tratado (testemunha), ao longo de quatro semanas após tratamento.

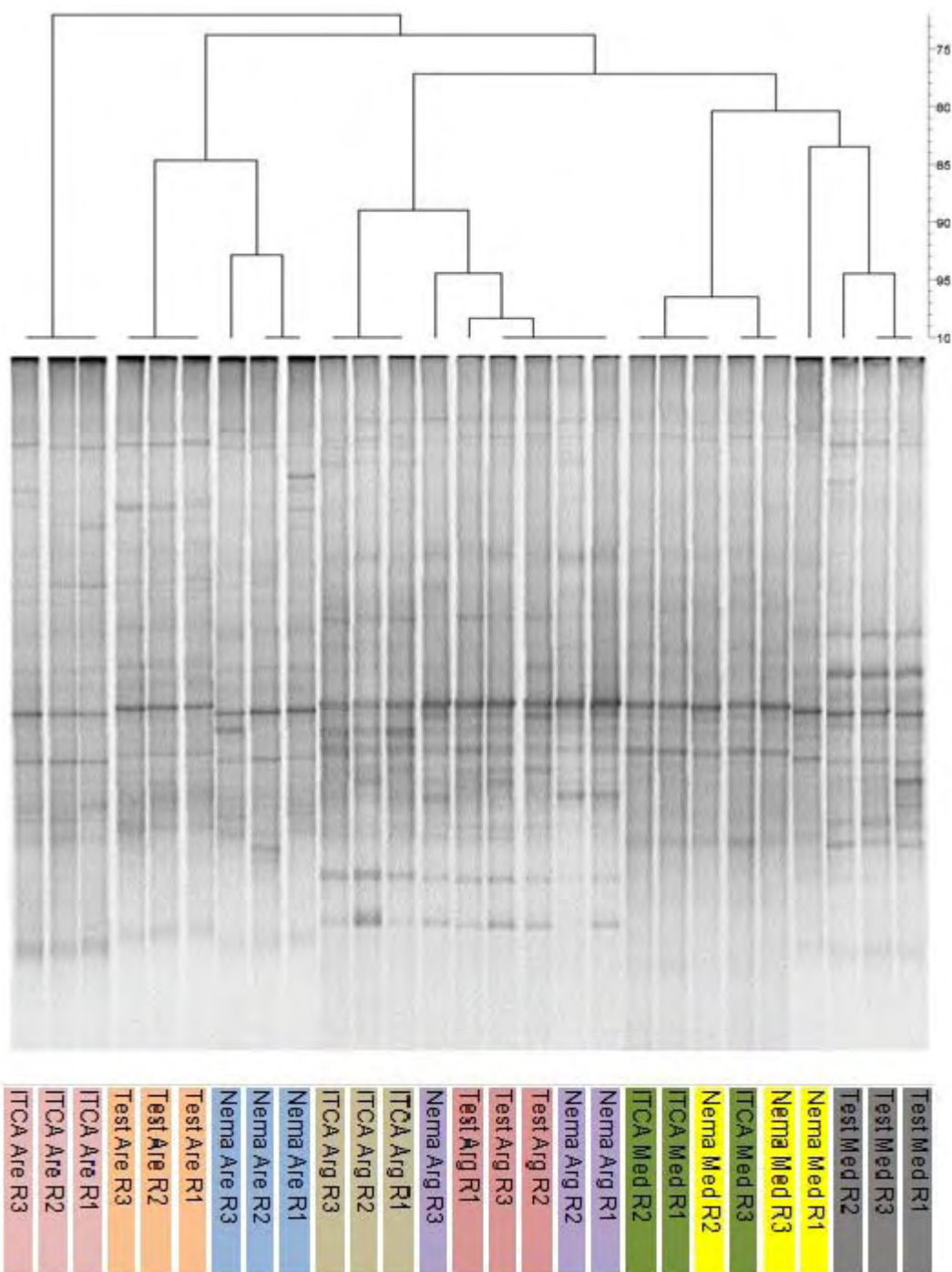


Figura 7- Dendrograma construído com os perfis de bandas do DGGE produzidas pela comunidade fúngica dos solos tratados com isotiocianato de alila (ITCA) e o nematicida Terbufós logo após o tratamento. As diferenças entre os perfis são indicadas pela porcentagem de similaridade, calculada pelo coeficiente de similaridade de Dirce e análise de agrupamento pelo método não ponderado de conjunto de pares por médias aritméticas (UPGMA). (ITCA = isotiocianato de alila, Test = testemunha e Nema = Terbufós; are, arg e med = solo de textura arenosa, argilosa e média, respectivamente; rep1, 2 e 3 = repetições).

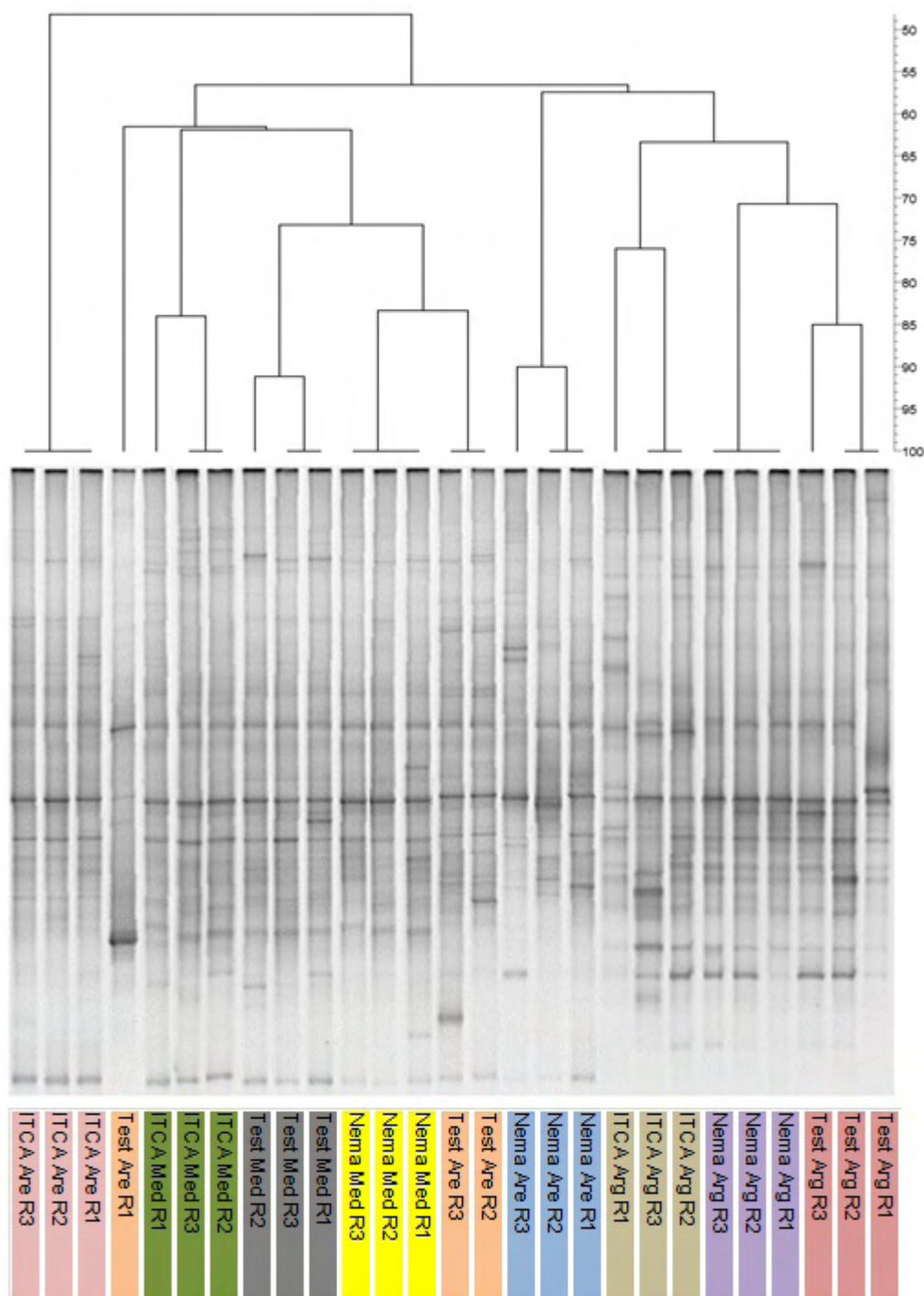


Figura 8- Dendrograma construído com os perfis de bandas do DGGE produzidas pela comunidade fúngica dos solos tratados com isotiocianato de alila (ITCA) e o nematicida Terbufós aos sete dias após o tratamento. As diferenças entre os perfis são indicadas pela porcentagem de similaridade, calculada pelo coeficiente de similaridade de Dirce e análise de agrupamento pelo método não ponderado de conjunto de pares por médias aritméticas (UPGMA). (ITCA = isotiocianato de alila, Test = testemunha e Nema = Terbufós; are, arg e med = solo de textura arenosa, argilosa e média, respectivamente; rep1, 2 e 3 = repetições).

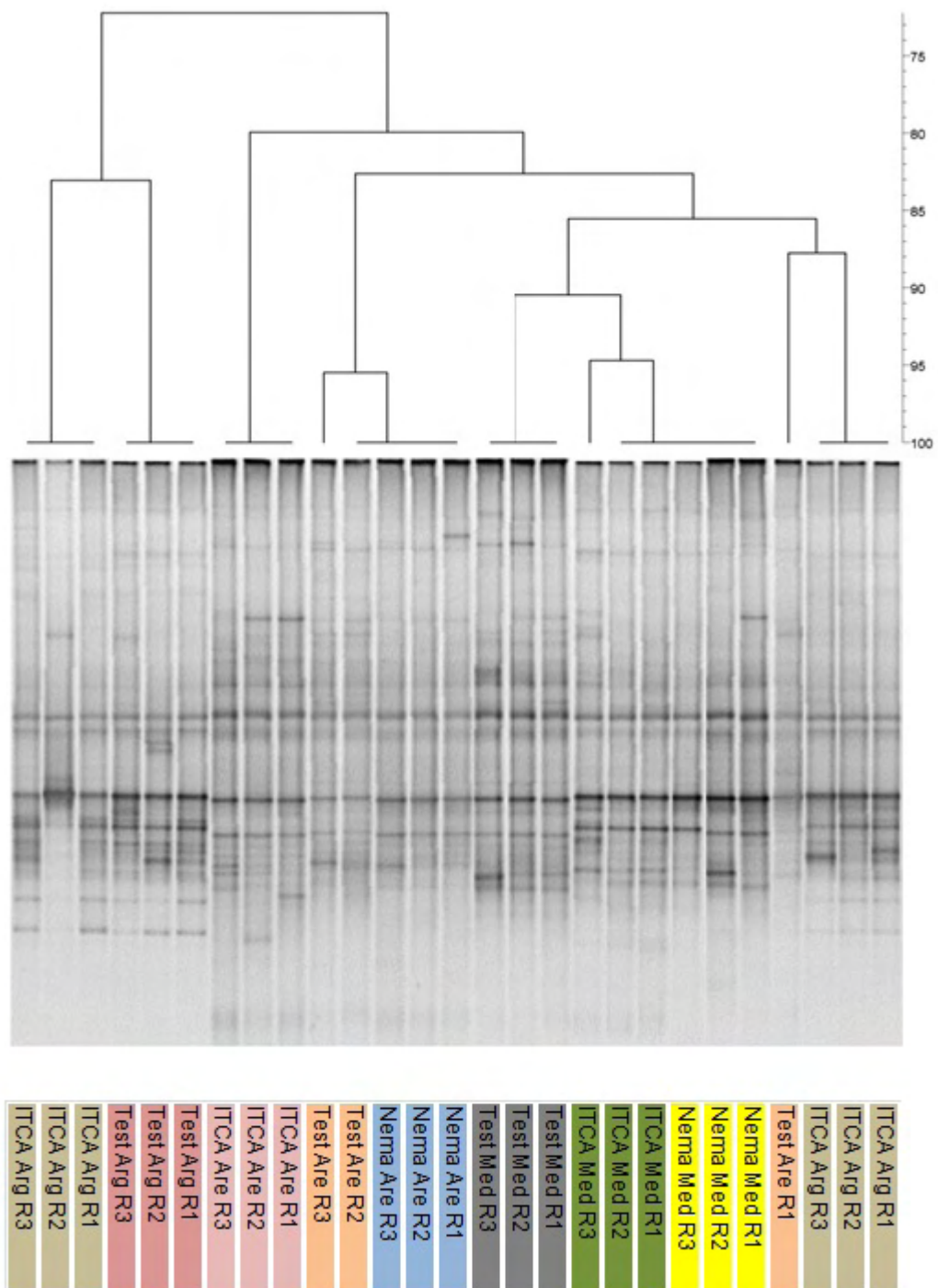


Figura 9- Dendrograma construído com os perfis de bandas do DGGE produzidas pela comunidade fúngica dos solos tratados com isotiocianato de alila (ITCA) e o nematicida Terbufós aos quatorze dias após o tratamento. As diferenças entre os perfis são indicadas pela porcentagem de similaridade, calculada pelo coeficiente de similaridade de Dirce e análise de agrupamento pelo método não ponderado de conjunto de pares por médias aritméticas (UPGMA). (ITCA = isotiocianato de alila, Test = testemunha e Nema = Terbufós; are, arg e med = solo de textura arenosa, argilosa e média, respectivamente; rep1, 2 e 3 = repetições).

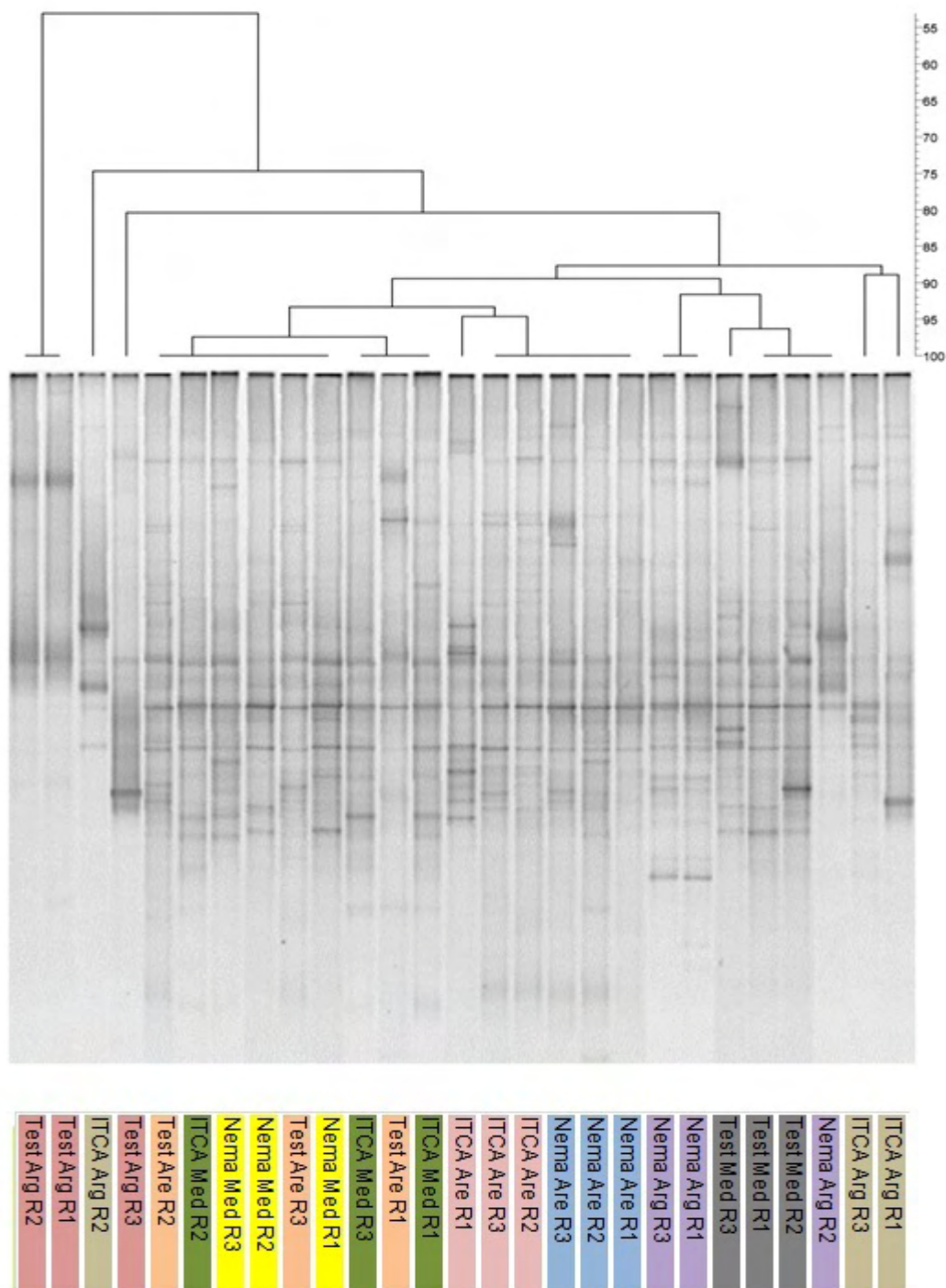


Figura 10- Dendrograma construído com os perfis de bandas do DGGE produzidas pela comunidade fúngica dos solos tratados com isotiocianato de alila (ITCA) e o nematicida Terbufós aos vinte e um dias após o tratamento. As diferenças entre os perfis são indicadas pela porcentagem de similaridade, calculada pelo coeficiente de similaridade de Dirce e análise de agrupamento pelo método não ponderado de conjunto de pares por médias aritméticas (UPGMA). (ITCA = isotiocianato de alila, Test = testemunha e Nema = Terbufós; are, arg e med = solo de textura arenosa, argilosa e média, respectivamente; rep1, 2 e 3 = repetições).

Com 21 dias após a fumigação, o solo argiloso tratado com ITCA e o nematicida apresentaram similaridade de 55% com a testemunha (figura 10). Já nos solos de texturas média e arenosa os tratamentos apresentaram similaridade entre si de  $\geq 90\%$ . No final da avaliação, aos 28 dias após a fumigação, a aplicação de ITCA e do Terbufós no solo argiloso apresentou similaridade de 78% com a testemunha, e os solos de textura média e arenoso os tratamentos com ITCA e Terbufós apresentaram similaridade igual ou superior a 80% em relação a testemunha (figura 11).

O fingerprint da comunidade bacteriana do solo no início do ensaio exibiu os seguintes resultados: no solo arenoso os tratamentos com ITCA e nematicida apresentaram similaridade com a testemunha de 90% (figura 12). No solo de textura média a similaridade foi de 75% e no solo de textura argilosa a similaridade dos tratamentos com a testemunha foi de 85% e entre os tratamentos de 90%. Aos sete dias após a fumigação os tratamentos no solo de textura média apresentaram similaridade de 100%, no solo de textura argilosa, a similaridade foi de 96% e no solo de textura arenosa, a similaridade do tratamento com nematicida e a testemunha foi de 90%, mas foi de 93% em relação ao tratamento com ITCA (figura 13).

Após 14 dias de fumigação o tratamento com ITCA no solo de textura arenosa apresentou similaridade com a testemunha de 84% e no tratamento com nematicida, a similaridade foi de 98% (figura 14). No solo de textura média o tratamento com nematicida apresentou similaridade com a testemunha de 84% e para o tratamento com ITCA apresentou 86% de similaridade, já para o solo de textura argilosa, os tratamentos apresentaram 85% de similaridade entre si.

Aos 21 dias após a fumigação, o fingerprint da comunidade bacteriana do solo obteve para o solo argiloso quando submetido ao tratamento com ITCA 85% de similaridade com a testemunha, e a aplicação do nematicida apresentou 75% (figura 15).

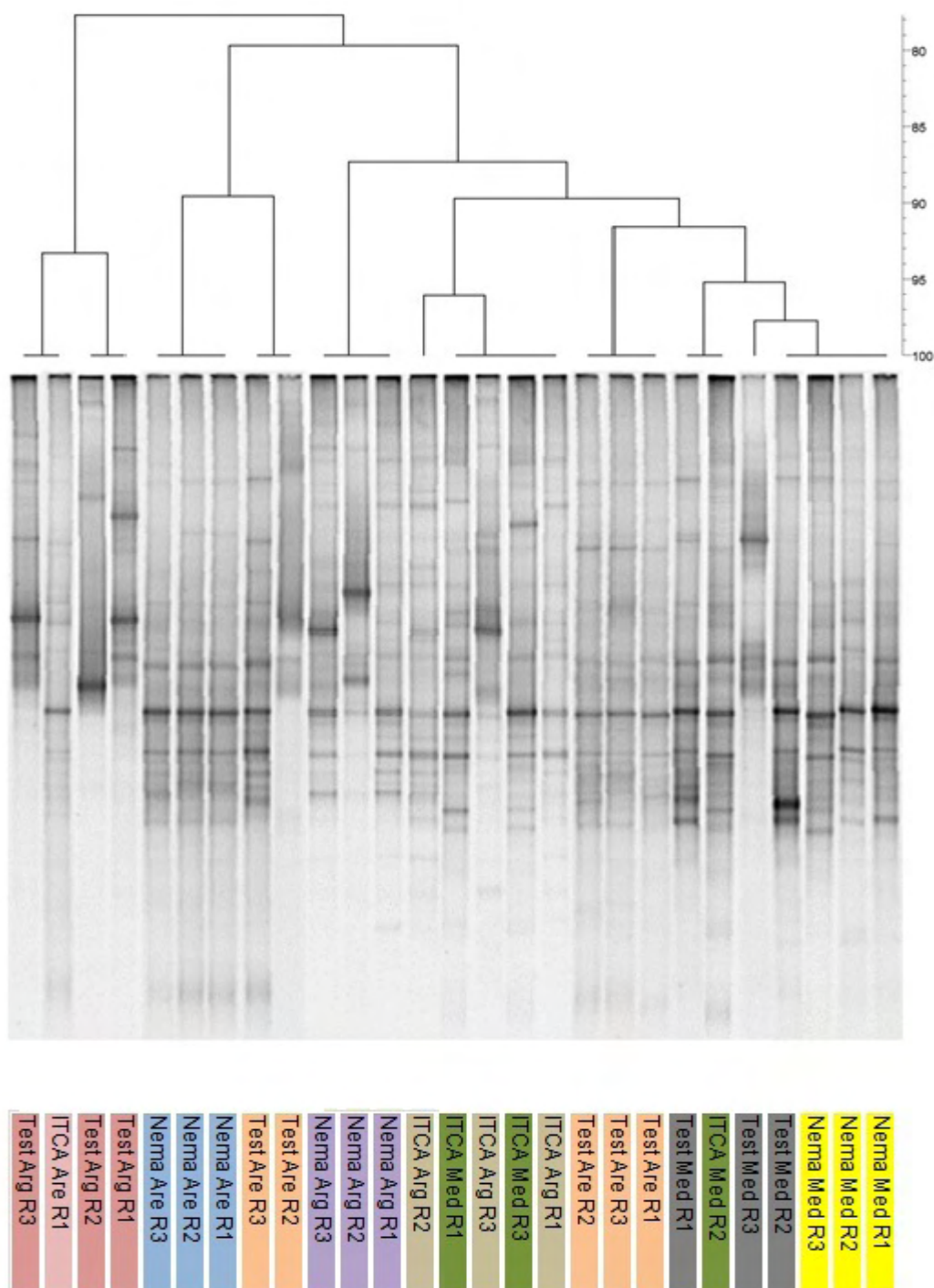


Figura 11- Dendrograma construído com os perfis de bandas do DGGE produzidas pela comunidade fúngica dos solos tratados com isotiocianato de alila (ITCA) e o nematicida Terbufós aos vinte e oito dias após o tratamento. As diferenças entre os perfis são indicadas pela porcentagem de similaridade, calculada pelo coeficiente de similaridade de Dirce e análise de agrupamento pelo método não ponderado de conjunto de pares por médias aritméticas (UPGMA). (ITCA = isotiocianato de alila, Test = testemunha e Nema = Terbufós; are, arg e med = solo de textura arenosa, argilosa e média, respectivamente; rep1, 2 e 3 = repetições).

No solo de textura média a aplicação de ITCA apresentou similaridade com a testemunha de 75% e o nematicida 85%, e no solo de textura arenosa os tratamentos com ITCA e nematicida apresentaram similaridade com a testemunha de 75% (figura 15). No final da avaliação, aos 28 dias após a fumigação, o tratamento com ITCA no solo de textura argilosa apresentou similaridade com a testemunha de 85% e o nematicida 90% (figura 16). No solo de textura média após tratamento com nematicida o fingerprint é igual a testemunha e o ITCA apresentou 80% de similaridade, já para o solo arenoso o nematicida teve 77% de similaridade com a testemunha e o tratamento com ITCA 95% de similaridade.

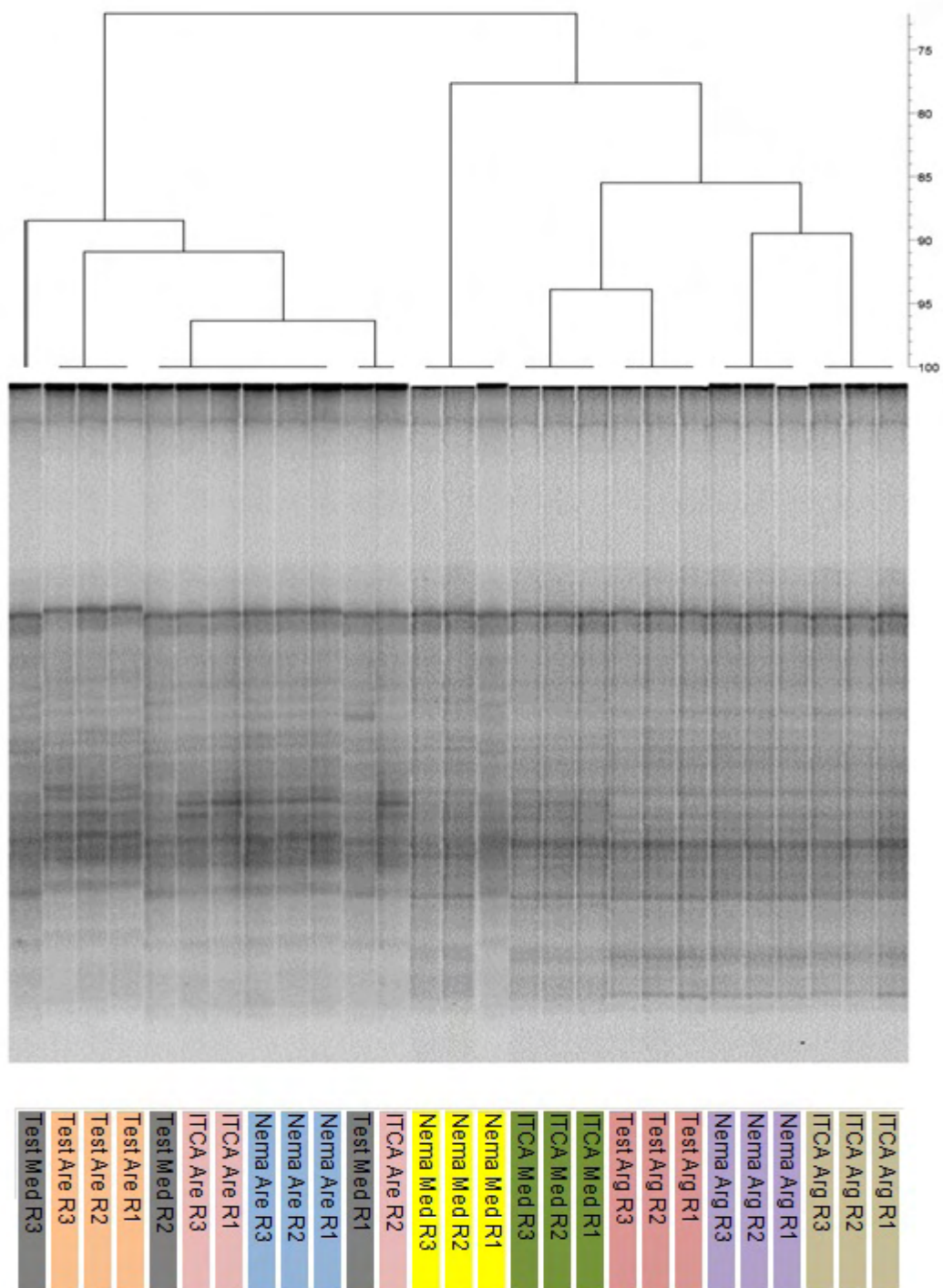


Figura 12- Dendrograma construído com os perfis de bandas do DGGE produzidas pela comunidade bacteriana dos solos tratados com isotiocianato de alila (ITCA) e o nematicida Terbufós aos zero dia após o tratamento. As diferenças entre os perfis são indicadas pela porcentagem de similaridade, calculada pelo coeficiente de similaridade de Dirce e análise de agrupamento pelo método não ponderado de conjunto de pares por médias aritméticas (UPGMA). (ITCA = isotiocianato de alila, Test = testemunha e Nema = Terbufós; are, arg e med = solo de textura arenosa, argilosa e média, respectivamente; rep1, 2 e 3 = repetições).

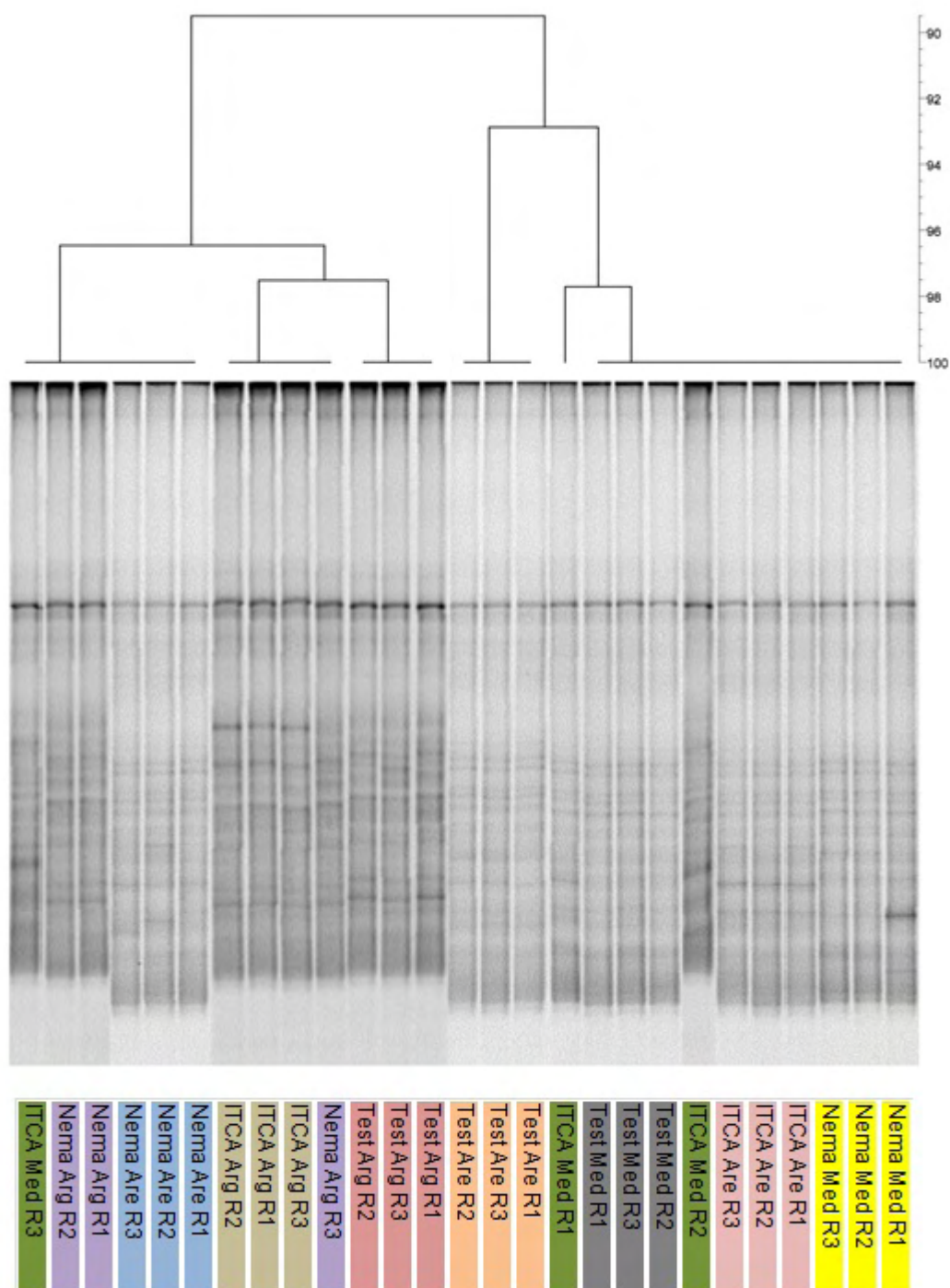


Figura 13- Dendrograma construído com os perfis de bandas do DGGE produzidas pela comunidade bacteriana dos solos tratados com isotiocianato de alila (ITCA) e o nematicida Terbufós aos sete dias após o tratamento. As diferenças entre os perfis são indicadas pela porcentagem de similaridade, calculada pelo coeficiente de similaridade de Dirce e análise de agrupamento pelo método não ponderado de conjunto de pares por médias aritméticas (UPGMA). (ITCA = isotiocianato de alila, Test = testemunha e Nema = Terbufós; are, arg e med = solo de textura arenosa, argilosa e média, respectivamente; rep1, 2 e 3 = repetições).

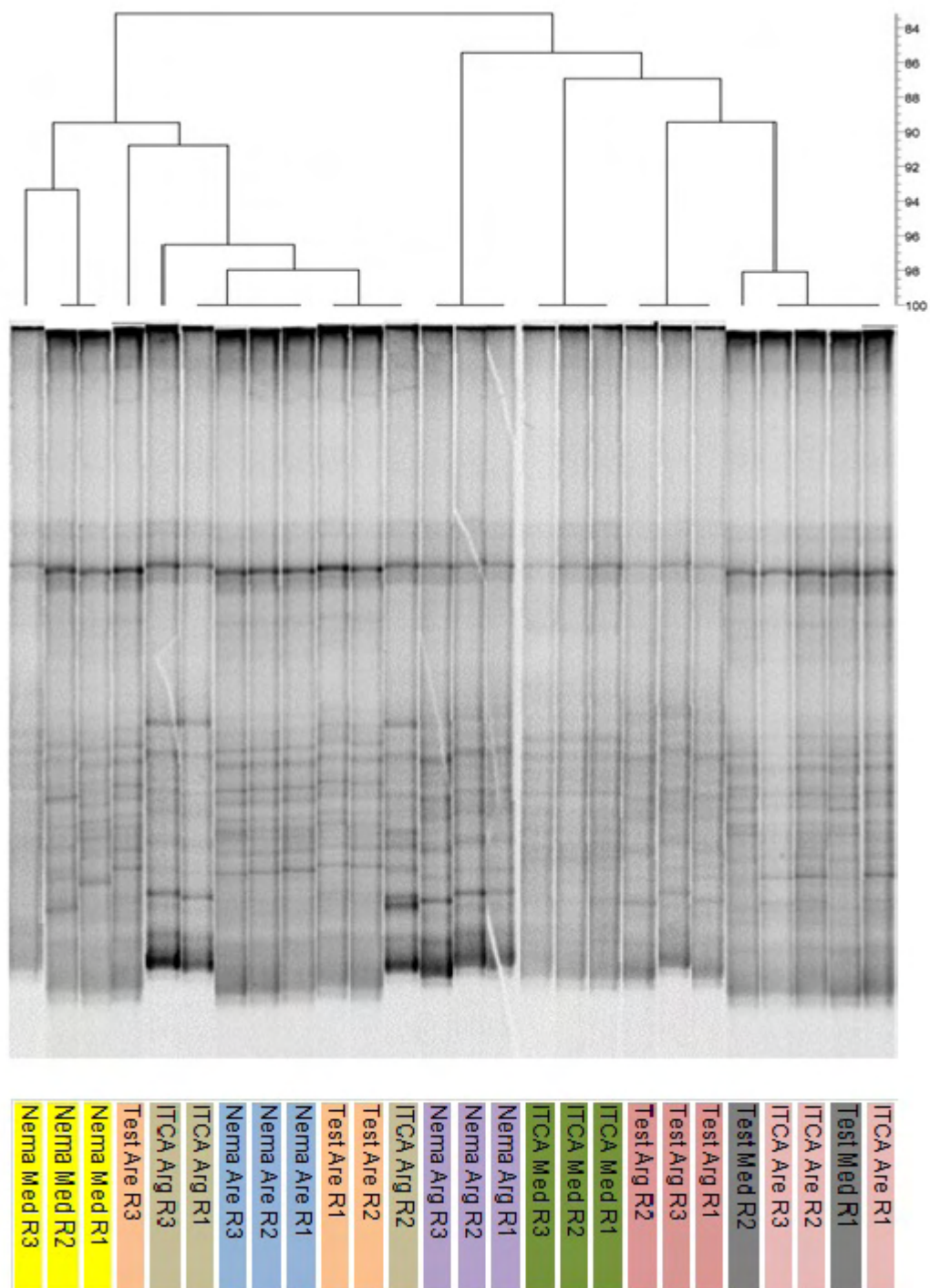


Figura 14- Dendrograma construído com os perfis de bandas do DGGE produzidas pela comunidade bacteriana dos solos tratados com isotiocianato de alila (ITCA) e o nematicida Terbufós aos quatorze dias após o tratamento. As diferenças entre os perfis são indicadas pela porcentagem de similaridade, calculada pelo coeficiente de similaridade de Dirce e análise de agrupamento pelo método não ponderado de conjunto de pares por médias aritméticas (UPGMA). (ITCA = isotiocianato de alila, Test = testemunha e Nema = Terbufós; are, arg e med = solo de textura arenosa, argilosa e média, respectivamente; rep1, 2 e 3 = repetições).

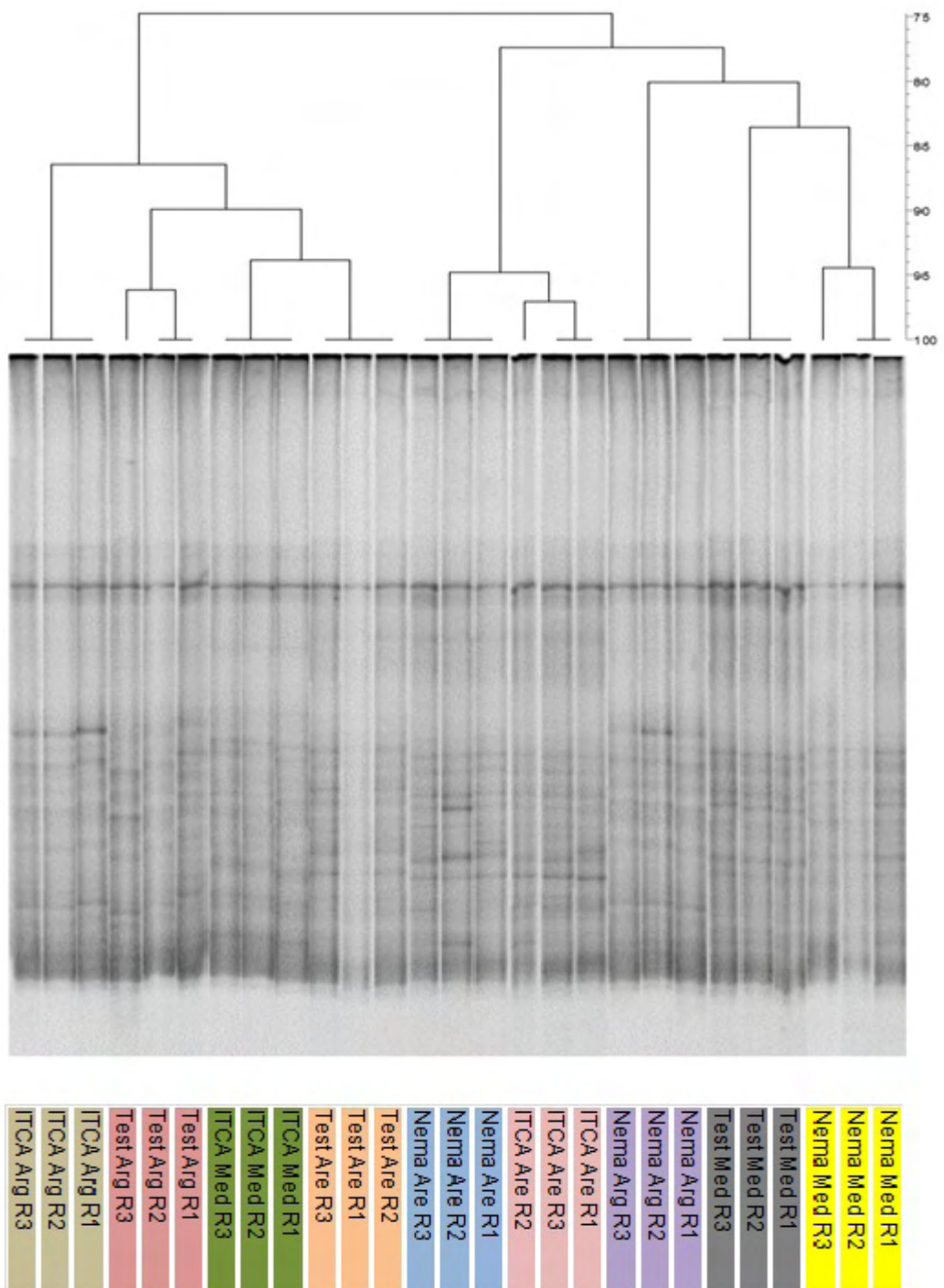


Figura 15- Dendrograma construído com os perfis de bandas do DGGE produzidas pela comunidade bacteriana dos solos tratados com isotiocianato de alila (ITCA) e o nematicida Terbufós aos vinte e um dias após o tratamento. As diferenças entre os perfis são indicadas pela porcentagem de similaridade, calculada pelo coeficiente de similaridade de Dirce e análise de agrupamento pelo método não ponderado de conjunto de pares por médias aritméticas (UPGMA). (ITCA = isotiocianato de alila, Test = testemunha e Nema = Terbufós; are, arg e med = solo de textura arenosa, argilosa e média, respectivamente; rep1, 2 e 3 = repetições).

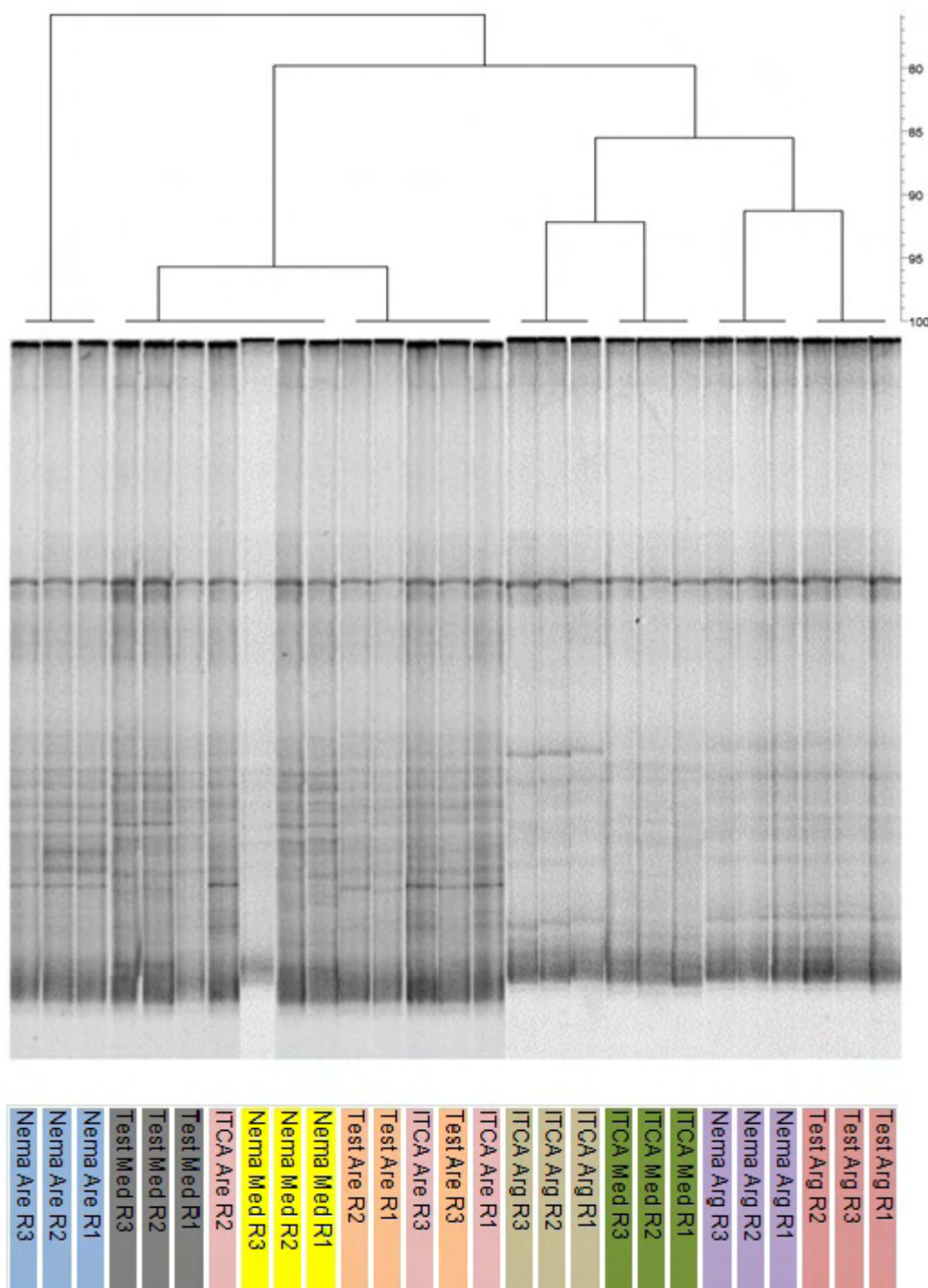


Figura 16- Dendrograma construído com os perfis de bandas do DGGE produzidas pela comunidade bacteriana dos solos tratados com isotiocianato de alila (ITCA) e o nematicida Terbufós aos vinte e oito dias após o tratamento. As diferenças entre os perfis são indicadas pela porcentagem de similaridade, calculada pelo coeficiente de similaridade de Dirce e análise de agrupamento pelo método não ponderado de conjunto de pares por médias aritméticas (UPGMA). (ITCA = isotiocianato de alila, Test = testemunha e Nema = Terbufós; are, arg e med = solo de textura arenosa, argilosa e média, respectivamente; rep1, 2 e 3 = repetições).

Os valores dos índices de dominância, diversidade e equitabilidade para a comunidade de fungos do solo foram similares entre os tratamentos e texturas dos solos estudados no decorrer do tempo (tabela 1). A equitabilidade decresceu ligeiramente no decorrer do tempo, mas tendeu a se equilibrar posteriormente. Considerando a população bacteriana, o índice de dominância foi crescente para todos os tratamentos, independente da textura do solo, mas o índice cresceu menos no solo argiloso (tabela 2). Pelo índice de diversidade, os solos tratados ou não exibiram redução de valores, mas percebe-se que há tendência de equilíbrio aos 28 dias, quando comparado com o início do ensaio. Informação semelhante foi observada com a equitabilidade. Quanto ao índice de riqueza das bactérias, houve decréscimo especialmente nos sete primeiros dias, mas a redução do índice diminuiu até o 28º dia, para todos os tratamentos. Não houve variação sensível nesses índices, quando o tratamento ocorreu no solo argiloso, arenoso ou de textura média. Pelo agrupamento das bandas resultantes do DGGE de fungos em todas as épocas de avaliação verificou-se a formação de dois grupos divergindo em 100% (figura 17). Os dois grupos formados apresentaram alta divergência entre os tratamentos ao longo do tempo, não formando grupos pela aplicação de ITCA ou Terbufós ao solo, mas a tendência de formar grupos pela data de avaliação, mostrando que o processo de fumigação (incubação do solo) por si só afetou a dinâmica, colonização e recolonização dos fungos no solo.

**Tabela 1** – Índices de dominância, diversidade, equitabilidade e riqueza para população de fungos no solo tratado com isotiocianato de alila (ITCA) ou Terbufós, ou não tratado, ao longo de quatro semanas, em solo arenoso, argiloso e de textura média.

Tratamentos	Dominância					Diversidade					Equitabilidade					Riqueza				
	Dias																			
	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28
<b>ARENOSO</b>																				
Testemunha	0,2	0,3	0,4	0,2	0,3	0,9	0,7	0,7	0,9	0,8	4,4	3,7	3,4	4,5	3,5	8	6	5	9	9
Terbufós	0,2	0,2	0,4	0,3	0,4	0,9	0,9	0,6	0,8	0,7	4,3	4,5	3,3	4,0	3,2	8	8	5	8	6
ITCA	0,3	0,2	0,4	0,2	0,4	0,8	1,0	0,6	0,9	0,7	4,1	4,8	3,3	4,5	3,5	7	11	5	9	7
<b>MÉDIA</b>																				
Testemunha	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3	0,9	1,0	0,8	0,9	0,9	4,8	5,0	3,7	4,7	4,0	9	11	8	10	9
Terbufós	0,2	0,2	0,4	0,2	0,4	0,9	1,1	0,6	0,9	0,7	4,4	5,0	3,2	4,3	3,1	9	13	5	10	7
ITCA	0,2	0,2	0,4	0,2	0,3	1,0	1,0	0,7	0,9	0,9	4,9	5,0	3,1	4,6	4,0	11	12	6	10	9
<b>ARGILOSA</b>																				
Testemunha	0,2	0,2	0,4	0,4	0,4	1,0	1,0	0,7	0,6	0,7	4,7	4,7	3,5	3,3	3,5	10	11	6	4	7
Terbufós	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,9	1,0	0,7	0,8	0,9	4,5	5,1	3,5	4,1	4,2	9	12	5	8	9
ITCA	0,2	0,1	0,4	0,3	0,3	0,9	1,0	0,6	0,7	0,8	4,6	5,3	3,3	3,5	3,9	9	12	5	7	7

Média de 3 repetições. Dominância (Berger-Parker), diversidade (Shanon-Wiever), equitabilidade (Hill) e riqueza (número de bandas no DGGE).

**Tabela 2** – Índices de dominância, diversidade, equitabilidade e riqueza para população de bactérias no solo tratado com isotiocianato de alila (ITCA) ou Terbufós ou não tratado, ao longo de quatro semanas, em três texturas de solos

Tratamentos	Dominância					Diversidade					Equitabilidade					Riqueza				
	Dias																			
	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28	0	7	14	21	28
<b>ARENOSO</b>																				
Testemunha	0,14	0,19	0,25	0,36	0,27	1,2	1,0	0,8	0,6	0,7	5,8	4,9	4,1	3,6	3,7	22	12	8	5	5
Terbufós	0,14	0,16	0,26	0,24	0,17	1,2	1,0	0,8	0,8	0,9	5,6	5,0	3,9	4,0	4,6	21	11	7	8	8
ITCA	0,15	0,18	0,25	0,26	0,28	1,2	1,0	0,9	0,8	0,8	5,3	4,8	4,0	3,9	3,8	18	11	9	8	7
<b>MÉDIA</b>																				
Testemunha	0,14	0,24	0,23	0,27	0,27	1,3	0,8	0,5	0,8	0,7	6,2	4,1	2,3	3,9	3,9	24	6	8	7	6
Terbufós	0,18	0,22	0,24	0,29	0,22	1,2	0,8	0,9	0,7	0,8	5,5	4,1	4,1	3,9	4,1	21	8	9	7	7
ITCA	0,13	0,29	0,34	0,28	0,20	1,4	0,8	0,8	0,8	0,8	6,8	3,9	3,6	3,9	4,3	29	8	7	7	8
<b>ARGILOSA</b>																				
Testemunha	0,11	0,25	0,29	0,24	0,24	1,4	0,8	0,7	0,8	0,8	7,1	4,2	3,6	4,1	4,0	30	7	7	7	8
Terbufós	0,10	0,29	0,30	0,26	0,24	1,5	0,7	0,8	0,8	0,8	7,5	3,9	3,8	3,8	4,1	35	6	8	7	7
ITCA	0,14	0,35	0,28	0,25	0,19	1,3	0,8	0,8	0,9	0,9	6,0	3,5	3,9	4,2	4,3	24	7	8	8	8

Média de 3 repetições. Dominância (Berger-Parker), diversidade (Shanon-Wiever), equitabilidade (Hill) e riqueza (número de bandas no DGGE).

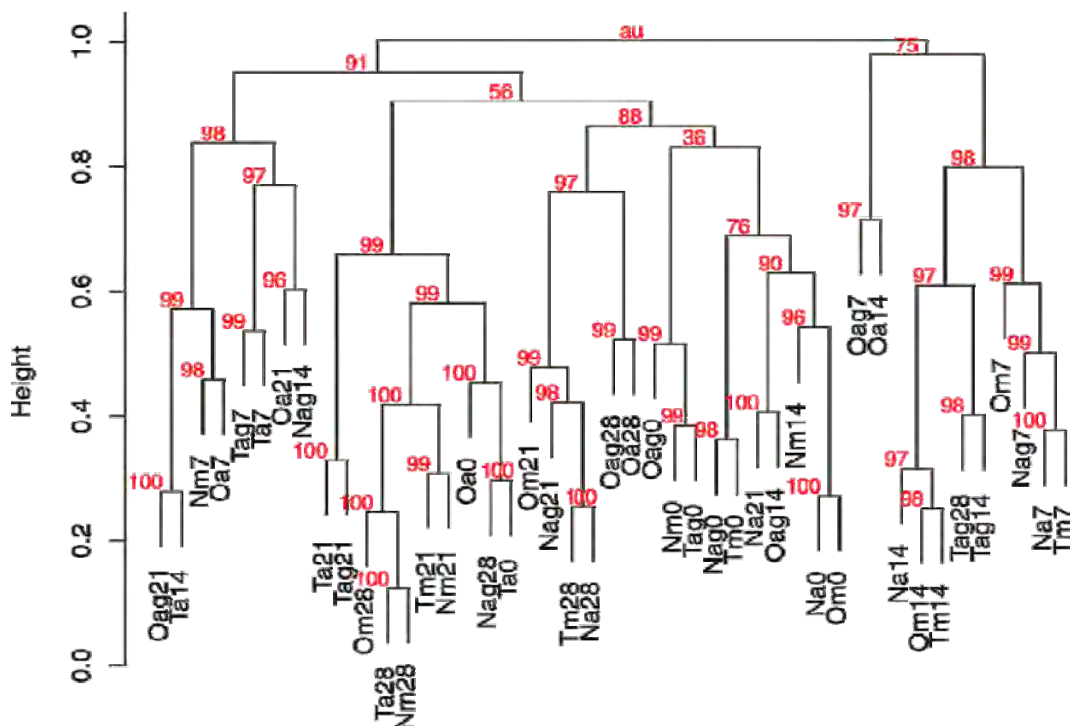


Figura 17 - Dendrograma baseado no número e posição das bandas do DGGE de fungo a partir das Figuras 7 à 11. Coeficiente de correlação de Pearson e método não ponderado de par de média aritmética (UPGMA) foram utilizados para construir o dendrograma. Valores P bootstrap foram calculados com base em 1000 reamostragem usando o pacote pclus do programa estatístico R conforme metodologia proposta por Ishii, Kadota *et al.* (2009). A primeira letra do nome do ramo significa o tratamento (I=ITCA, N=Terbufós e T=Testemunha), a segunda e terceira letras significam a textura do solo (a=arenoso, ag=argiloso e m=média) e os números significam o número de dias após o tratamento.

O agrupamento do DGGE de bactérias em todas as épocas de avaliação acarretou a formação de quatro grupos divergindo em 90% (figura 18) e um tratamento divergindo 100% dos demais. Os três grupos formados apresentam alta divergência entre os tratamentos ao longo do tempo, não formando grupos pela aplicação de ITCA ou Terbufós ao solo. Dois grupos foram formados pela época de avaliação (tempo 0 e 21). Os dois grupos restantes foram uma mistura de tempo e tratamentos agrupados.

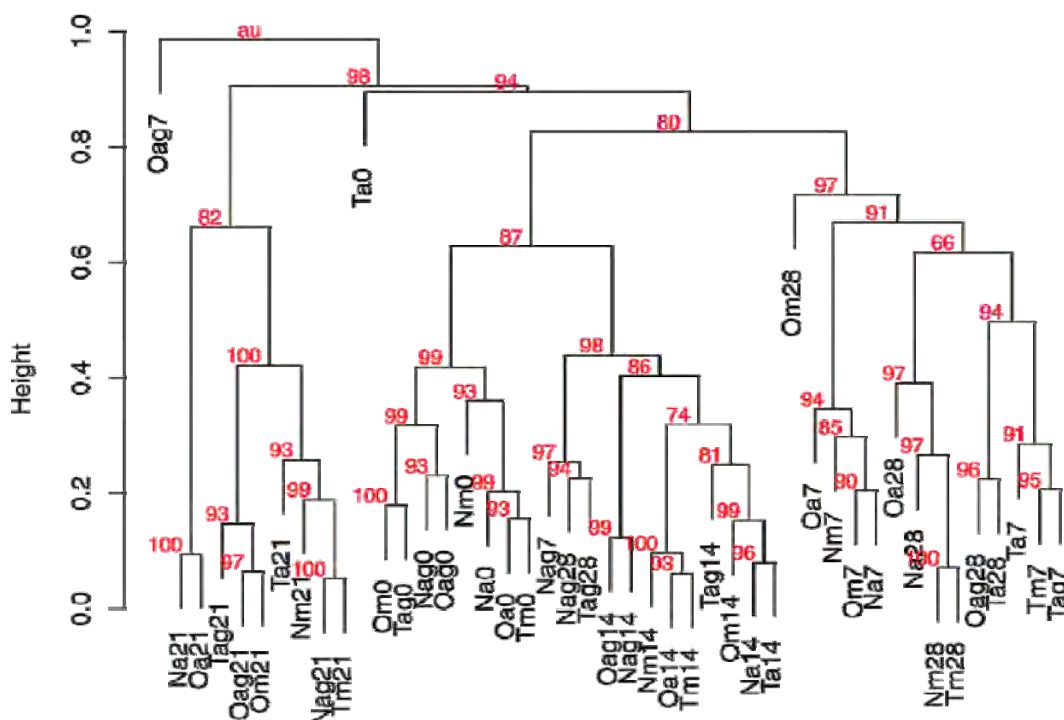


Figura 18 - Dendrograma baseado no número e posição das bandas do DGGE de bactéria a partir das Figuras 12 à 16. Coeficiente de correlação de Pearson e método não ponderado de par de média aritmética (UPGMA) foram utilizados para construir o dendrograma. Valores P bootstrap foram calculados com base em 1000 reamostragem usando o pacote pclus do programa estatístico R conforme metodologia proposta por Ishii, Kadota *et al.* (2009). A primeira letra do nome do ramo significa o tratamento (O=ITCA, N=Nematicida e T=Testemunha), a segunda e terceira letra significam a textura do solo (a=arenoso, ag=argiloso e m=media) e os números significam quantos dias após a fumigação estava o tratamento.

#### 4. Discussão

De uma maneira geral houve recomposição da CBM nos solos tratados aos 28 dias do tratamento com ITCA, resultando em menor impacto negativo sobre a microbiota do solo. Em trabalhos com a incorporação de farinha desengordura de semente de mostarda, a microbiota do solo não foi alterada ao longo do tempo, mostrando que outros produtos da mostarda não causam desequilíbrio por longos períodos (Lima, 2006; Schurt, 2006). No solo arenoso, com a aplicação do terbufós e do ITCA não foi detectado grande alteração no CBM em nenhuma das épocas de avaliação, pois neste solo os microrganismos estavam em pequeno número (Chau, Bagtzoglou *et al.*, 2011).

Em solos de textura arenosa, o efeito do ITCA foi menor do que em solos de textura argilosa, pois em solos de textura arenosa os microorganismos presentes ali estão adaptados às condições adversas, como a falta de água e nutrientes (Chau, Bagtzoglou *et al.*, 2011). No solo arenoso pelas adaptações dos microorganismos presentes no final da avaliação apresentou a biomassa dos microorganismos nos tratamentos igual ou superior à testemunha sem aplicação, o que não foi observado nos solos de textura média e argiloso. Nos solos de textura média e argilosa a quantidade e diversidade naturalmente de microorganismos presentes são maiores e com a aplicação de compostos químicos, as alterações na comunidade microbiana são mais fáceis de serem mensuráveis. Em solos com alto teor de argila, para o controle de inseto de solo, a dose necessária para controlar  $\geq 90\%$  foi maior em comparação aos solos com baixo teor de argila (Matthiessen e Shackleton, 2005), o que não foi observado neste estudo para alteração da comunidade microbiana.

Com o aumento do CBM ao longo do tempo é observado aumento a respiração basal, o aumento da respiração foi devido a maior quantidade de microorganismos presentes nos solos. O aumento da respiração basal dos solos tratados com nematicida e ITCA, independente da textura estudada foi observada, a atividade dos microorganismos degradando o xenobiótico presente na amostra, ocorre aumento na respiração, pois para degradar os compostos ocorre muito gasto de energia (Austin, Castro *et al.*, 2009; Gimsing, Strobel *et al.*, 2009). Trabalho com a incorporação da planta de brássicas ao solo é relatado redução da respiração basal, mas estas avaliações foram logo após a incorporação do material fresco ao solo (Omirou, Rousidou *et al.*, 2011). Em solos com maiores teor de argila a degradação do isotiocianato é mais rápida (Gimsing, Strobel *et al.*, 2009), assim nos solos de textura média a argilosa, além da maior quantidade de microorganismos presentes, ocorre maior velocidade da degradação dos mesmos. Nestes solos a respiração basal dos tratamentos se igualou à testemunha aos 14 dias quando provavelmente os xenobióticos aplicados tinham sido totalmente degradados. Em estudos com fumigantes sintéticos (Vapam sódico, Brometo de metila e Cloropicrina), resultados similares foram encontrados para o carbono da biomassa e a respiração, sendo que demoraram mais para igualar à testemunha nestes

trabalhos (Klose e Ajwa, 2004; Stromberger, Klose *et al.*, 2005; Yamamoto, Ultra *et al.*, 2008)

A atividade da enzima  $\beta$ -glicosidade foi reduzida no solo de textura arenosa pela aplicação do ITCA, e sua atividade foi aumentando com o tempo, igualando à testemunha aos 21 dias. O nematicida não alterou a atividade neste solo e o comportamento da atividade desta enzima seguiu o mesmo da biomassa, pois esta enzima está relacionada ao ciclo do carbono. Nos solos de textura média e argilosa, a aplicação do nematicida e do ITCA reduziu a atividades desta. Com a reestruturação da quantidade de microrganismo presente no solo pela aplicação do ITCA e nematicida, a quantidade que foi produzida da enzima  $\beta$ -glicosidade também foi reduzida, assim estes produtos não inibem a atividade desta e assim matam os microrganismos que a produzem. Em trabalhos com outros xenobióticos, a atividade da enzima  $\beta$ -glicosidade foi reduzida, como a aplicação de brometo de metila, extratos vegetais (Klose, Acosta-Martinez *et al.*, 2006; Yamamoto, Ultra *et al.*, 2008), visto que estes produtos também matam grande quantidade dos microrganismos.

A incorporação de tecidos de brássicas no solo e outras fontes de matéria orgânica no solo aumentaram a atividade desta enzima (Klose e Tabatabai, 2002; Pellerin, Mollier *et al.*, 2007; Passos, Dos Reis *et al.*, 2008; Omirou, Rousidou *et al.*, 2011), visto que estes estão relacionados ao ciclo do carbono com a degradação da matéria orgânica, mesmo que estes materias incorporados contenham substâncias que matenham os microrganismos. Os microrganismos resistentes são favorecidos e aumentam rapidamente sua população e, conseqüentemente, a produção desta enzima (Galletti, Sala *et al.*, 2008; Rahmanpour, Backhouse *et al.*, 2009; Gabler, Mercier *et al.*, 2010).

A atividade da enzima fosfatase ácida no solo arenoso foi crescente até 14 dias após a fumigação, ocorrendo queda aos 21 dias e aumentou novamente aos 28 dias, independente do tratamento. Os tratamentos com nematicida e ITCA diminuíram a atividade desta enzima até os 14 dias após a fumigação. Nos solos de textura média e argiloso, ocorreu redução da atividade da enzima até os 21 dias após a fumigação, sendo que no solo de textura média aos 28 dias a atividade da enzima nos tratamentos era igual à

testemunha. Nos três tipos de solos estudados observou aumento da atividade da enzima ao longo do tempo. Os microrganismos para a degradação dos xenobióticos precisam de energia (ATP), assim ocorre aumento da atividade da enzima fosfatase ácida ao longo do tempo e este comportamento é observado para outros xenobióticos (Klose e Ajwa, 2004).

A atividade da enzima fosfatase básica nos tratamentos com ITCA e nematicida no solo arenoso ocorreu redução de 50% na primeira avaliação, aumentando a atividade ao longo do tempo, e aos 14 dias houve aumento de 50% da atividade em relação à testemunha, mantendo este valor elevado no tratamento com nematicida aos 21 dias e o tratamento com ITCA reduziu a atividade igualando à testemunha mantendo este valor aos 28 dias. Já nos solos de textura média e argiloso, o comportamento da atividade da enzima fosfatase básica foi igual à testemunha, exceto quando do tratamento com ITCA no solo de textura média aos zero dias após a fumigação, onde a atividade foi 350% maior que a testemunha. No solo arenoso, onde a quantidade de nutrientes é menor, os microrganismos para a degradação dos xenobióticos produzem maior quantidade de fosfatase básica, mesmo em solos ácidos, para obtenção de maior quantidade de fósforo. Nos solos onde a abundância de nutrientes é maior não há necessidade deste incremento na produção da enzima fosfatase básica para maior disponibilidade de fósforo.

A população de bactérias nitrificantes do solo teve incremento com a aplicação do ITCA e nematicida nos solos de texturas arenosa e média. A taxa de nitrificantes no solo de textura arenosa foi maior em todos os tempos estudados quando este foi tratado com ITCA; já com nematicida aos 28 dias após a aplicação, a taxa estava menor que a testemunha. Nestes solos, a população das bactérias nitrificantes é pequena. No solo de textura argilosa, a população de bactérias nitrificantes é alta e com a aplicação do ITCA e o nematicida houve redução da mesma no tempo de zero dia, mas a população voltou rapidamente à sua condição natural, pois aos 7 dias a taxa de nitrificação estava igual à testemunha, permanecendo nesta condição até os 21 dias, sendo que na última avaliação a taxa de nitrificação na testemunha é maior. Com a incorporação de tecidos de brássicas ocorre estímulo da nitrificação do solo (Ryan, Kirkegaard *et al.*, 2006), o incremento de nitrogênio

oriundo das brássicas (tecido) favorece o crescimento da população de bactérias nitrificantes (Ryan, Kirkegaard *et al.*, 2006; Snyder, Johnson-Maynard *et al.*, 2010). A aplicação do isotiocianato de fenil provoca redução da nitrificação do solo (Bending e Lincoln, 2000) em solos com alto teor de argila, corroborando com os resultados obtidos. Em solos com pouco teor de argila, onde a população de bactérias nitrificantes é menor, o desequilíbrio causado pelo isotiocianato pode favorecer o crescimento destas bactérias, pois com a morte de parte da população microbiana há liberação do conteúdo citoplasmático para a solução do solo, enriquecendo a disponibilidade de nutrientes. O grande incremento da população no solo arenoso após os 14 dias coincide com o maior valor da quantidade de carbono da biomassa.

O dendrograma construído ao longo do tempo ocorre agrupamento dos tratamentos em cada época de avaliação, evidenciando que o processo de incubação (período de fumigação) do solo afeta a diversidade de fungos. Durante o processo de incubação, o solo colocado em saco plástico fechado cria um ambiente com alta concentração de CO<sub>2</sub>, visto que a respiração basal do tempo 0 é elevada, com aumento da CO<sub>2</sub> o crescimento dos fungos fica prejudicado e a distribuição do fungo no solo não seja homogênea. Após a abertura, os fungos presentes no solo voltam a crescer normalmente, assim quando analisa o fingerprint no tempo, pode-se agrupar por datas, este comportamento também foi encontrado para a comunidade bacteriana do solo.

O fingerprint (DGGE) da comunidade de fungos após a aplicação do ITCA observa-se redução da intensidade de algumas bandas e o incremento de outras, evidenciando o distúrbio causado na comunidade fúngica do solo. Quando analisados a dominância e equitabilidade ocorre incremento do índice no solo arenoso quando tratado com ITCA. O incremento na dominância de algumas populações de fungo é devido alguns serem resistentes ou tolerantes ao isotiocianato, como *Sclerotinia sclerotiorum* (Rahmanpour, Backhouse *et al.*, 2009) e *Trichoderma* spp. (Galletti, Sala *et al.*, 2008). O nematicida Terbufós também ocasionou distúrbio à comunidade igual ao ITCA, não houve diferença no distúrbio em função da textura do solo. A maior diferença no fingerprint foi encontrado aos 7 e 28 dias após a fumigação, pois com o passar do tempo houve reestruturação da comunidade de fungo do solo. A incorporação de

repolho ao solo ocasionou reestruturação da comunidade de fungo do filo ascomycota, sendo que a comunidade foi agrupada também pelos dias de avaliação e não houve perda da diversidade e riqueza (Omirou, Rousidou *et al.*, 2011), corroborando com os resultados deste trabalho. A aplicação de ITCA ou Terbufós ao solo não altera de forma significativa a comunidade fúngica do solo, pois com o tempo esta tende a voltar à sua composição natural, com a distribuição não homogênea de fungo no solo, onde houve alta similaridade entre os tratamentos e pouco agrupamento das repetições, independente do tratamento e tipo de solo.

A comunidade bacteriana do solo durante o processo de fumigação, com a elevação da concentração de CO<sub>2</sub> durante a fumigação propicia o crescimento de bactérias anaeróbicas, independente do tratamento e do tipo de solo, foi encontrado valor de riqueza e diversidade maior aos zero dia após a fumigação, do que as outras datas de avaliação, pelo aumento da população destas bactérias anaeróbicas. O fingerprint em todos os tempos que foram avaliados foi encontrado similaridade superior a 75% entre os tratamentos e texturas do solo. A aplicação do ITCA e Terbufós ao solo reduz o tamanho da população bacteriana, mas como as bactérias se multiplicam rapidamente não foi detectado grandes variações. As pequenas variações encontradas foram em poucas bandas no DGGE, mostrando especificidade dos compostos químicos por determinados grupos de bactérias. O isotiocianato, quando incorporado com o tecido da planta, favorece a comunidade bacteriana do solo, pois a degradação deste composto ocorre principalmente por este grupo de microrganismo (Rumberger e Marschner, 2003; 2004; Ryan, Kirkegaard *et al.*, 2006), ou utilizam nitrogênio oriundo da degradação do isotiocianato ou do tecido vegetal da Brássica (Ryan, Kirkegaard *et al.*, 2006). Outros fumigantes utilizados para o controle de patógenos do solo afetam mais a comunidade de fungo e pouco a comunidade de bactéria do solo (Klose e Ajwa, 2004; Yamamoto, Ultra *et al.*, 2008; Niemi, Heiskanen *et al.*, 2009; Zhang, Xu *et al.*, 2010; Omirou, Rousidou *et al.*, 2011).

## 5. Conclusão

O ITCA e o terbufós reduzem o CBM dos solos, mas há a tendência de se normalizar em período de tempo superior a 28 dias.

A respiração basal dos microrganismos é aumentada em relação a testemunha quando são aplicados ITCA e nematicida, mas nos solos de textura média e argiloso, aos 14 dias após o tratamento, tendeu voltar à condição natural; o mesmo não aconteceu no solo de textura arenosa.

Ocorre redução da atividade da enzima  $\beta$ -glicosidase nos solos tratados com ITCA e Terbufós em relação ao solo testemunha, não restabelecendo a condição natural ou igual à testemunha até os 28 dias após a fumigação. A enzima fosfatase ácida teve sua atividade reduzida nas três texturas de solos tratados com ITCA e Terbufós, sendo que no solo de textura arenosa a atividade da enzima dos tratamentos ficou igual à testemunha aos 21 dias após a fumigação.

A atividade da enzima fosfatase básica não apresentou grandes variações com os tratamentos.

Em solos com teor de argila baixo (textura média e arenosa), a aplicação do ITCA e Terbufós estimulou a nitrificação potencial nos solos de diferentes texturas.

A nitrificação potencial seguiu o mesmo padrão nos solos tratados ou não, mas tendeu a ser maior no solo de textura argilosa, com menor impacto sobre a atividade microbiana.

Não houve perda da diversidade de fungo e bactéria nos solos tratados com ITCA e Terbufós.

A utilização do ITCA para controle de nematóides, não afeta a ecologia microbiana do solo, pois a partir do período de 28 dias, espera-se a normalização da atividade dos microrganismos, visto que a diversidade não foi afetada.

## 6. Referências Bibliográficas

AGUIAR, N. D. C. **Tecnologia de uso da torta e do óleo essencial de mostarda no controle de *Meloidogyne exigua***. 2008. 65 (Mestrado em Fitopatologia). Fitopatologia, Dissertação de Mestrado em Fitopatologia. UFV/Viçosa

AKHTAR, M.; ALAM, M. M. Utilization of Waste Materials in Nematode Control - a Review. **Bioresource Technology**, v. 45, n. 1, p. 1-7, 1993.

AUSTIN, E. E. et al. Assessment of 10 years of CO<sub>2</sub> fumigation on soil microbial communities and function in a sweetgum plantation. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 514-520, 2009.

BENDING, G. D.; LINCOLN, S. D. Inhibition of soil nitrifying bacteria communities and their activities by glucosinolate hydrolysis products. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 32, n. 8-9, p. 1261-1269, 2000.

BROWN, P. D.; MORRA, M. J. Control of soil-borne plant pests using glucosinolate-containing plants. **Advances in Agronomy**, v. 61, p. 167-231, 1997.

CAPINERA, J. L. **Encyclopedia of entomology**. 2. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 2008. ISBN 9781402062421.

CASTRO, D. B. **Uso do óleo essencial de mostarda no controle de *Meloidogyne enterolobii* (= *M. mayaguensis*) em pomar de goiabeira**. 2010. 53 (Mestrado em Fitopatologia). Fitopatologia, Dissertação de Mestrado em Fitopatologia. UFV/Viçosa

CHAU, J. F.; BAGTZOGLU, A. C.; WILLIG, M. R. The Effect of Soil Texture on Richness and Diversity of Bacterial Communities. **Environmental Forensics**, v. 12, n. 4, p. 333-341, 2011.

CHEN, Y. R. et al. Phenylethyl isothiocyanate induces apoptotic signaling via suppressing phosphatase activity against c-Jun N-terminal kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 42, p. 39334-39342, 2002.

COHEN, M. F.; YAMASAKI, H.; MAZZOLA, M. Brassica napus seed meal soil amendment modifies microbial community structure, nitric oxide production and incidence of *Rhizoctonia* root rot. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 37, n. 7, p. 1215-1227, 2005.

DAYAN, F. E.; CANTRELL, C. L.; DUKE, S. O. Natural products in crop protection. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 12, p. 4022-4034, 2009.

DHINGRA, O. D. et al. Essential oil of mustard to control *Rhizoctonia solani* causing seedling damping off and seedling blight in nurser. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 6, p. 683-686, 2004.

DROBNICA, L. et al. ANTIFUNGAL ACTIVITY OF ISOTHIOCYANATES AND RELATED COMPOUNDS .I. NATURALLY OCCURING ISOTHIOCYANATES AND THEIR ANALOGUES. **Applied Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 701-&, 1967.

FERRAZ, S.; FREITAS, L. G. Use of Plants and Natural Products. In: CHEN, Z. X.; CHEN, S. Y., et al (Ed.). **Nematology: Advances and Perspectives. Nematode Management and Utilization**, v.2, 2004. p.931-977.

GABLER, F. M. et al. Integration of continuous biofumigation with *Muscodor albus* with pre-cooling fumigation with ozone or sulfur dioxide to control postharvest gray mold of table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, v. 55, n. 2, p. 78-84, 2010.

GALLETTI, S. et al. Trichoderma spp. tolerance to Brassica carinata seed meal for a combined use in biofumigation. **Biological Control**, v. 45, n. 3, p. 319-327, 2008.

GIMSING, A. L.; STROBEL, B. W.; HANSEN, H. C. B. Degradation and Sorption of 2-Propenyl and Benzyl Isothiocyanate in Soil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, n. 6, p. 1178-1184, 2009.

GOULART, R. R. **Biofumigação com Brassica rapa para o controle de *Meloidogyne exigua* em diferentes texturas e umidades do solo**. 2007. 52 (Mestrado em Fitopatologia). Fitopatologia, Dissertação de Mestrado em Fitopatologia. UFV/Viçosa

HENDERSON, D. R. et al. Mustard biofumigation disrupts biological control by Steinernema spp. nematodes in the soil. **Biological Control**, v. 48, n. 3, p. 316-322, 2009.

ISHII, S.; KADOTA, K.; SENOO, K. Application of a clustering-based peak alignment algorithm to analyze various DNA fingerprinting data. **Journal of Microbiological Methods**, v. 78, n. 3, p. 344-350, 2009.

KLOSE, S.; ACOSTA-MARTINEZ, V.; AJWA, H. A. Microbial community composition and enzyme activities in a sandy loam soil after fumigation with methyl bromide or alternative biocides. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 38, n. 6, p. 1243-1254, 2006.

KLOSE, S.; AJWA, H. A. Enzyme activities in agricultural soils fumigated with methyl bromide alternatives. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 36, n. 10, p. 1625-1635, 2004.

KLOSE, S.; TABATABAI, M. A. Response of glycosidases in soils to chloroform fumigation. **Biology and Fertility of Soils**, v. 35, n. 4, p. 262-269, 2002.

LIMA, A. O. **Uso da Mostarda (*Brassica rapa*) como biofumigante de solo no controle de *Meloidogyne incognita***. 2006. 55 (Mestrado em Fitopatologia). Fitopatologia, Dissertação de Mestrado em Fitopatologia. UFV/Viçosa

MATTHIESSEN, J. N.; SHACKLETON, M. A. Biofumigation: environmental impacts on the biological activity of diverse pure and plant-derived isothiocyanates. **Pest Management Science**, v. 61, n. 11, p. 1043-1051, 2005.

MAZZOLA, M.; ZHAO, X. W. Brassica juncea seed meal particle size influences chemistry but not soil biology-based suppression of individual agents inciting apple replant disease. **Plant and Soil**, v. 337, n. 1-2, p. 313-324, 2010.

NIEMI, R. M. et al. Microbial toxicity and impacts on soil enzyme activities of pesticides used in potato cultivation. **Applied Soil Ecology**, v. 41, n. 3, p. 293-304, 2009.

OLIVEIRA, R. D. L. et al. Glucosinolate content and nematicidal activity of Brazilian wild mustard tissues against *Meloidogyne incognita* in tomato. **Plant and Soil**, v. 341, n. 1-2, p. 155-164, 2011.

OMIROU, M. et al. The Impact of Biofumigation and Chemical Fumigation Methods on the Structure and Function of the Soil Microbial Community. **Microbial Ecology**, v. 61, n. 1, p. 201-213, 2011.

PASSOS, S. R. et al. Enzymatic activity and bacterial community profile in soil under solarization e biofumigation. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 43, n. 7, p. 879-885, 2008.

PELLERIN, S. et al. Effect of incorporation of Brassica napus L. residues in soils on mycorrhizal fungus colonisation of roots and phosphorus uptake by maize (*Zea mays* L.). **European Journal of Agronomy**, v. 26, n. 2, p. 113-120, 2007.

PONTES, N. C. **Óleo essencial de mostarda e controle experimental da murcha bacteriana do tomateiro (*Ralstonia solanacearum*): efetividade e toxidez ao patógeno**. 2009. 69 (Mestrado em Fitopatologia). Fitopatologia, Dissertação de Mestrado em Fitopatologia. UFV/Viçosa

RAHMANPOUR, S.; BACKHOUSE, D.; NONHEBEL, H. M. Induced tolerance of *Sclerotinia sclerotiorum* to isothiocyanates and toxic volatiles from Brassica species. **Plant Pathology**, v. 58, n. 3, p. 479-486, 2009.

RUMBERGER, A.; MARSCHNER, P. 2-Phenylethylisothiocyanate concentration and microbial community composition in the rhizosphere of canola. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 35, n. 3, p. 445-452, 2003.

\_\_\_\_\_. 2-Phenylethylisothiocyanate concentration and bacterial community composition in the rhizosphere of field-grown canola. **Functional Plant Biology**, v. 31, n. 6, p. 623-631, 2004.

RYAN, M. H.; KIRKEGAARD, J. A.; ANGUS, J. F. Brassica crops stimulate soil mineral N accumulation. **Australian Journal of Soil Research**, v. 44, n. 4, p. 367-377, 2006.

SCHURT, D. A. **Potencial do isotilcianato de alilo no controle de *Sclerotium rolfsii* e *Sclerotinia sclerotiorum***. 2006. 57 (Mestrado em Fitopatologia). Fitopatologia, Dissertação de Mestrado em Fitopatologia. UFV/Viçosa

SNYDER, A. J.; JOHNSON-MAYNARD, J. L.; MORRA, M. J. Nitrogen mineralization in soil incubated with (15)N-labeled Brassicaceae seed meals. **Applied Soil Ecology**, v. 46, n. 1, p. 73-80, 2010.

STROMBERGER, M. E. et al. Microbial populations and enzyme activities in soils fumigated with methyl bromide alternatives. **Soil Science Society of America Journal**, v. 69, n. 6, p. 1987-1999, 2005.

UNEP. Montreal Protocol on Substances that deplete the ozone layer : United Nations Environment Programme. Methyl bromide technical options committee. **Assessment of Alternative to Methyl Bromide**, 1998.

VIG, A. P. et al. Bio-protective effects of glucosinolates - A review. **Lwt-Food Science and Technology**, v. 42, n. 10, p. 1561-1572, 2009.

WANG, A. S. et al. Impact of Indian Mustard (*Brassica juncea*) and Flax (*Linum usitatissimum*) Seed Meal Applications on Soil Carbon, Nitrogen, and Microbial Dynamics. **Applied and Environmental Soil Science**, v. 2012, p. 1-14, 2012.

YAMAMOTO, T. et al. Effects of methyl bromide fumigation, chloropicrin fumigation and steam sterilization on soil nitrogen dynamics and microbial properties in a pot culture experiment. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 54, n. 6, p. 886-894, 2008.

ZHANG, C. P. et al. Impact of imazethapyr on the microbial community structure in agricultural soils. **Chemosphere**, v. 81, n. 6, p. 800-806, 2010.

## **Conclusões Gerais**

O ITCA interferiu na atividade metabólica e quantidade dos microrganismos, principalmente no solo de textura argilosa, pois as maiores alterações dos indicadores microbiológicos em relação a testemunha foi mensurada neste solo. A comunidade de nematoide do solo foi reduzida drasticamente com a aplicação do ITCA, independente do nível trófico do nematoide. A utilização do ITCA para o controle de nematoides não causa alterações permanentes na comunidade microbiana do solo e nos indicadores microbiológicos, pois em curto espaço de tempo estes voltam a sua condição natural. A recomendação do ITCA para controle de fitonematoides é eficiente no controle dos mesmos e não causa impacto negativo permanente no ecossistema solo.