

ESTUDOS MICROBIOLÓGICOS PRELIMINARES DE AMOSTRAS DE SOLO DA ILHA DE PORTO SANTO

Por HELENA MOREIRA ¹, CONCEIÇÃO SANTOS ¹ & SÓNIA MENDO ¹

Com 4 tabelas e 1 figura

ABSTRACT. The Porto Santo Island suffers presently from a process of erosion, which conducted to efforts to minimize it by reforestation programs. Erosion results from the action of several factors such as climatic conditions and soil properties, in which microbial characteristics play an important role. We present here a study of microbial soil properties in 10 different places in Porto Santo that are being (or may become soon) reforested, by reporting those prominent bacteria and fungi. In all samples we found an average abundance of bacteria and fungi lower than the average reported for fertile soils. The soil samples also presented low specific richness with the bacterial genus / species *Arthrobacter* spp. and *Aureobacterium* spp. / *Corynebacterium aquaticum* being the most representative in most of the soils and the fungus of the genus *Penicillium* being present in all samples.

RESUMO. A ilha de Porto Santo sofre actualmente de uma erosão generalizada, situação que tem vindo a ser minimizada através de um repovoamento florestal. Sabe-se que a erosão resulta da influência combinada de múltiplos factores, tais como as condições climáticas e as propriedades dos solos, entre as quais se incluem as suas características microbiológicas. Neste estudo foram caracterizadas 10 amostras de solos locais, que estão (ou poderão ser) alvo de uma reflorestação, no que diz respeito à sua população microbiana (bactérias e fungos) mais proeminente. Verificou-se que, em todas as amostras, a abundância bacteriana e fúngica é inferior à encontrada, em valores médios, num solo fértil. As amostras apresentam também baixa riqueza específica, sendo os géneros / espécies representativos, as bactérias *Arthrobacter* spp. e *Aureobacterium* spp. / *Corynebacterium aquaticum* e fungos do género *Penicillium*.

¹ Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Campus de Santiago, 3810-193 Aveiro, Portugal.
E-mail: helenamoreira@hotmail.com

INTRODUÇÃO

A ilha de Porto Santo pertence ao arquipélago da Madeira e possui cerca de 42 Km² de área geográfica (FRANCO, 1994). Esta ilha foi descrita, pelos que lá aportaram em 1419, como detentora de um coberto vegetal viçoso. No entanto, uma exploração desregrada levou ao declínio da sua floresta e à deterioração dos seus solos. Este facto imprime actualmente a necessidade de minimizar os consequentes processos erosivos que daí advieram, com uma reflorestação adequada, onde a microbiologia inerente aos solos tem um papel preponderante.

Em termos microbiológicos, cada solo possui características específicas, constituindo um ambiente único onde são encontrados vários tipos de organismos, tais como bactérias e fungos, que estabelecem entre si complexas interacções. É no solo que ocorrem grande parte das reacções bioquímicas relacionadas com a degradação da matéria orgânica e com a nutrição das plantas (ALEXANDER, 1991). A maioria dos microrganismos dos solos é saprófita e de vida livre (OLIVEIRA, 1998 *in* FERREIRA & SOUSA, 1998) e alguns contribuem directamente para a fertilidade do solo, através da fixação do azoto atmosférico ou da solubilização de fosfatos. As comunidades microbianas estabelecem uma série de inter-relações entre as diversas populações que a constituem, contribuindo, desta forma, para o carácter ímpar de cada solo.

TORSVIK *et al.* (1996) calcularam a presença de cerca de 6000 genomas bacterianos diferentes por grama de solo, tomando por comparação o genoma da *Escherichia coli*, sendo estes os organismos que apresentam maior diversidade, podendo existir milhares de espécies numa pequena porção de solo. As espécies bacterianas comuns pertencem aos géneros *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* e *Streptococcus* (ALEXANDER, 1991). OLIVEIRA (1998 *in* FERREIRA & SOUSA, 1998) salienta também a presença dos géneros *Rhizobium*, *Azotobacter* e *Nitrobacter*, embora estes constituam apenas uma pequena parte da comunidade total. No entanto, em termos de biomassa, são os fungos que predominam entre os microrganismos do solo, essencialmente devido ao seu diâmetro e à extensiva rede de hifas que possuem (ALEXANDER, 1991). Os fungos do solo podem ser simbioses de plantas, patogénicos de animais ou plantas ou decompositores de matéria orgânica, sendo este último o seu papel mais importante (OLIVEIRA, 1998 *in* FERREIRA & SOUSA, 1998). Existem centenas de espécies que habitam o solo e a maioria localiza-se próximo da superfície, devido às condições de aerobiose, onde a sua biomassa pode representar 1-15 Mg/ha (VARENNES, 2003). Alguns géneros mais comuns são *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Aspergillus*, sendo as espécies predominantes determinadas pelas condições físico-químicas que o solo apresenta (PELCZAR *et al.*, 1986). Os fungos são os organismos mais eficientes, no que diz respeito à utilização da matéria orgânica, incorporando cerca de metade dos nutrientes disponíveis nos materiais que decompõem. Para além disso, as suas hifas ajudam a estabilizar os agregados do solo (VARENNES, 2003).

TABELA 1 - Locais de recolha das amostras de solos da ilha de Porto Santo e respectiva numeração utilizada.

Amostra de solo	Locais de recolha
1 (A e B)	Encosta sudoeste do Pico do castelo e próximo do tanque – Dragoal.
2	Fonte da areia (zona de eolianitos calcoareníticos e zona de tufo vulcânico argilizado).
3	Encosta oriental do pico da Cabrita e encosta ocidental do Pico branco – Serra de Dentro.
4	A montante das Lapeiras – Campo de Cima.
5	Encosta ocidental da Rocha de Nossa Sr. ^a - Capela de Nossa Sr. ^a da Graça.
6	Vertente noroeste do pico de Ana Ferreira
7	Encostas orientais do Pico Juliana e do Pico do Facho – Serra de Dentro.
8	Encosta sul do Pico do Concelho – Zimbral e encosta norte do Pico do maçarico – Corgas.
9	Próximo da foz da Ribeira do Calhau – Calhau.
10	Encosta oriental do Cabeço do Dragoal.

2. Determinação da abundância e riqueza específica bacteriana e fúngica

Para cultivo e isolamento dos principais grupos de bactérias saprófitas de solo foram utilizados os meios de cultura “Plate-Count-Agar” (Merck®) e “Tryptic Soy Agar” (Merck®). Para isolamento de fungos foi usado o meio “Cooke Rose Bengal Agar” (Difco®). Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121 °C, durante 15 minutos, logo após a preparação. Três subamostras de um grama de cada amostra de solo foram colocadas em matrizes esterilizados contendo 100 ml de água desionizada, previamente esterilizada e sujeitos a 30 minutos de agitação. A partir desta solução, foram preparadas diluições seriadas (1/10, 1/1000 e 1/100 000), das quais se retiraram volumes de 1 ml que foram incorporados com o meio de cultura adequado, previamente arrefecido a 45 °C, para quantificação dos efectivos bacterianos. Retiraram-se volumes de 0,2 ml, de cada uma das diluições, que foram semeados em placas contendo meio de cultura apropriado, para quantificação dos efectivos fúngicos. As placas de Petri inoculadas, destinadas à quantificação bacteriana, foram incubadas a 37 °C durante cinco dias, e as destinadas à quantificação fúngica, foram incubadas a 35 °C, durante sete dias. Após este tempo determinou-se o número de colónias formadas, calculou-se a abundância de bactérias cultiváveis (UFC/g) e procedeu-se ao isolamento dos grupos mais abundantes presentes em cada amostra. Os isolados bacterianos foram, posteriormente, identificados pelos sistemas API® e Vitek®. No que se refere aos fungos analisou-se a sua abundância (n.º de Fungos/g) nas amostras em estudo e foram seleccionados os grupos mais abundantes, tendo-se procedido à sua identificação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo da microflora do solo é, de certa forma, um processo difícil, já que o próprio ambiente em que esta habita é bastante heterogêneo, sendo difícil de simular em laboratório. Para além da sua diversidade ser elevada e capaz de realizar uma panóplia de transformações químicas, os vários grupos de microrganismos são nutricionalmente diversos, o que dificulta a selecção de um meio de cultura para o isolamento (NANNIPIERI *et al.*, 2003). Apesar das limitações do método, a contagem em placa afigura-se o mais adequado no âmbito deste trabalho, na medida em que o seu intuito foi o de identificar os grupos de bactérias e fungos mais abundantes nos diferentes tipos de solos da ilha, num determinado momento.

Os microrganismos que foram isolados das várias amostras de solo encontram-se listados na Tabela 2. Verificou-se que a abundância bacteriana varia entre um mínimo de 5×10^4 (amostra 7) e um máximo de 9×10^6 UFC/g (amostra 6) (Tabela 3). O número de bactérias identificadas em todas as amostras não é elevado e estas diferem relativamente aos grupos mais abundantes. É de salientar que a amostra que possui maior riqueza específica bacteriana (amostra 3) é a segunda com menor abundância (UFC/g). A amostra 7, para além de possuir a menor abundância, apresenta também a menor riqueza específica. Estes resultados podem estar relacionados com as características físico-químicas dos solos de onde foram recolhidas as amostras.

A maioria das espécies bacterianas identificadas no presente estudo são habitantes usuais do solo. No entanto, observaram-se algumas excepções:

a) foi isolada uma bactéria do género *Corynebacterium*, na amostra 4, que foi identificada como *Corynebacterium amycolatum* / *Corynebacterium striatum* (82% de certeza na identificação), ambas habitantes usuais da pele humana e de mucosas (RENAUD *et al.*, 1998), embora tenham sido já isoladas de leite de vaca com mastite (KRIEG & HOLT, 1984). No entanto, a bactéria *Corynebacterium striatum* foi também identificada em solos (BALOWS *et al.*, 1992), não sendo este, porém, o seu ambiente natural. Deste modo, poder-se-á sugerir que a bactéria encontrada neste solo será *Corynebacterium striatum*.

b) tanto quanto é do nosso conhecimento, *Brevibacterium epidermis* foi apenas isolada a partir da pele humana (KRIEG & HOLT, 1984). No entanto, a sua presença é provável na amostra de solo 2 e é verificada na amostra 6, o que pode ser devido a uma contaminação durante a amostragem e/ou manipulação das amostras de laboratório. No entanto, não é de eliminar a hipótese desta bactéria poder eventualmente sobreviver no solo durante longos períodos de tempo depois deste ter contactado com pele humana, podendo, por isso, a amostra já ser portadora desta bactéria. Como foi verificado, na amostra 2 não há certeza da presença de *Brevibacterium epidermis*, podendo a bactéria isolada ser *Brevibacterium casei*, que poderá ter como *habitat* o solo (KRIEG & HOLT, 1984).

TABELA 2 - Bactérias identificadas nas amostras de solo.

Taxa identificados	Amostras de solos
<i>Acinomyces neuui anitratus</i>	6
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> – baumannii complex	8
<i>Arthrobacter</i> spp.	1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10
<i>Aureobacterium</i> spp.	2
<i>Aureobacterium</i> spp./ <i>Corynebacterium aquaticum</i>	2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10
<i>Brevibacterium epidermis</i>	6
<i>Bravibacterium</i> spp./ <i>Propionibacterium anes</i>	5
<i>Brevibacterium casei</i> / <i>Brevibacterium epidermis</i>	2
<i>Cellulomonas</i> spp.	2, 3
<i>Cellulomonas</i> spp./ <i>Microbacterium</i> spp.	3
<i>Cellulomonas turbata</i>	3
<i>Corynebacterium bovis</i>	5
<i>Corynebacterium diphtheriae gravis</i>	3
<i>Corynebacterium striatum</i> / <i>Corynebacterium amycolatum</i>	4
<i>Escherichia coli</i>	3, 6, 7, 8, 9
<i>Micrococcus luteus</i>	1, 3, 4, 10
<i>Oerskovia xanthineolytica</i>	3, 4
<i>Proteus mirabilis</i>	10
<i>Pseudomonas fluorescens</i> / <i>Pseudomonas putida</i>	1, 3, 5, 10
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	4, 8
<i>Rhodococcus equi</i> / <i>Rhodococcus</i> sp.	3
<i>Staphylococcus warneri</i>	5, 9
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	8, 10
<i>Vibrio alginolyticus</i>	3

TABELA 3 - Abundâncias bacterianas e fúngicas das amostras de solo.

Amostra de solo	Abundância bacteriana (UFC/g)	Abundância fúngica (N.º de Fungos/g)
1	1,7 x 10 ⁶	5,67 x 10 ⁴
2	0,8 x 10 ⁶	11,67 x 10 ⁴
3	0,7 x 10 ⁶	4,33 x 10 ⁴
4	3,4 x 10 ⁶	12,33 x 10 ⁴
5	2,0 x 10 ⁶	2,33 x 10 ⁴
6	9,0 x 10 ⁶	1,33 x 10 ⁴
7	0,05 x 10 ⁶	0,67 x 10 ⁴
8	3,3 x 10 ⁶	4,67 x 10 ⁴
9	4,5 x 10 ⁶	2,00 x 10 ⁴
10	3,8 x 10 ⁶	1,67 x 10 ⁴

c) *Micrococcus luteus* possui como *habitat* primário a pele de mamíferos, mas pode ter como *habitat* secundário o solo, onde é também frequente (KRIEG & HOLT, 1984).

d) *Oerskovia xanthineolytica* é uma espécie que raramente é encontrada em solos. No entanto, é encontrada em intestinos e fezes de milípedes, isópodes e oligoquetas (BALOWS *et al.*, 1992), que são organismos encontrados nos solos, o que, eventualmente, poderá justificar a sua presença na amostra 4.

e) *Staphylococcus warneri* é uma espécie que aparece preferencialmente em primatas, mas pode ser isolada, ocasionalmente, de animais domésticos. Dadas as características da ilha e do próprio local em questão (amostra 5), onde estas bactérias aparecem, presume-se que pertençam a gado, já que este aproveita a escassa vegetação do local para pastar. Este facto coincide também com a existência na mesma amostra de uma outra bactéria típica destes animais (*Corynebacterium bovis*).

f) *Vibrio alginolyticus* tem sido isolada de alimentos de origem aquática e de águas estuarinas, neríticas e salobras (MOLITORIS *et al.*, 1985). A sua presença na amostra 3 poderá ser devida à presença destas bactérias na água do mar. Através da formação de aerossóis, estas poderiam ter sido levadas, pelo vento, em direcção ao local de recolha. No entanto, o porquê desta espécie ser uma das representativas nesta amostra apenas poderá ser respondido com estudos mais específicos.

g) *Arthrobacter* spp. é um género de bactérias muito abundante em solos (KRIEG & HOLT, 1984). Este facto está de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, na medida em que esta apenas está ausente (pelo menos em termos de representatividade) na amostra 5.

Não foi detectada a presença de bactérias nitrificantes em qualquer uma das amostras. Estas bactérias constituem apenas uma pequena parte das bactérias do solo, o que, por si só, poderia justificar a ausência deste grupo nas amostras analisadas. A pequena quantidade de matéria orgânica presente no solo pode também justificar o facto do valor de abundância bacteriana estar abaixo daquele encontrado para um solo fértil (1×10^8 a 1×10^9 de UFC/g) (OLIVEIRA, 1998 *in* FERREIRA & SOUSA, 1998).

A abundância de fungos situa-se entre um mínimo de $0,67 \times 10^4$ (amostra 7) e um máximo de $11,67 \times 10^4$ (amostra 2) (Fungos/g) (Tabela 4). A amostra de solo 2 é a que possui maior abundância e a mais elevada riqueza específica fúngica. Em termos de representatividade, os fungos pertencentes ao género *Penicillium* foram os que mais se destacaram. Todas as espécies encontradas nas amostras possuem, como principal local de residência, os solos (PIT & HOCKING, 1997), embora *Aspergillus fumigatus* (amostra 1), um fungo termotolerante e ubíquo, não seja uma espécie dominante no solo. Este fungo é particularmente conhecido por causar a aspergilose em humanos (SMASON & REENEN-HOEKSTRA, 1988). Os fungos *Chaetomium funicola* e *Acremonium furcatum* foram encontrados na amostra 2, que corresponde a solo arenoso, onde estes fungos são vulgarmente encontrados (DOMSCH, 1993). *Penicillium crustosum* e

Penicillium aurantiogriseum são fungos responsáveis pela degradação de cereais, frutos, etc. (PIT & HOCKING, 1997). A sua presença nesta amostra poderá ser justificada pelo facto do local de recolha se encontrar muito próximo de uma lixeira a céu aberto de onde, possivelmente, são libertados esporos que se depositam nos terrenos periféricos.

TABELA 4 - Fungos identificados nas amostras de solo.

Amostra de solo	Taxa identificados
1	<i>Aspergillus fumigatus</i> Sterile micelia <i>Penicillium</i> sp.
2	<i>Chaetomium funicola</i> <i>Acremonium murorum</i> <i>Acremonium furcatum</i> <i>Verticillium tenerum</i> <i>Oidiendron tenuissimum</i> <i>Penicillium</i> sp.
3	<i>Penicillium crustosum</i> <i>Penicillium aurantiogriseum</i> <i>Penicillium</i> sp. <i>Beauveria</i> sp.
4	<i>Penicillium</i> sp. <i>Penicillium citrinum</i>
5	<i>Penicillium</i> sp. <i>Cunninghamella elegans</i> <i>Eupenicillium javanicum</i>
6	<i>Penicillium</i> sp. <i>Penicillium crustosum</i>
7	<i>Penicillium</i> sp.
8	<i>Penicillium</i> sp.
9	<i>Penicillium janthinellum</i>
10	<i>Penicillium</i> sp.

Na generalidade, os valores de abundância fúngica estão bastante abaixo daqueles encontrados, em termos médios, para um solo fértil, que apresenta valores entre 1×10^5 e 1×10^6 Fungos/g (OLIVEIRA, 1998 *in* FERREIRA & SOUSA, 1998), o que poderá, como no caso das bactérias, ser devido essencialmente ao facto dos solos serem pobres em matéria orgânica, consequência do escasso coberto vegetal actual.

CONCLUSÃO

Os microrganismos do solo possuem um papel particularmente activo na fertilidade de um solo, na medida em que possibilitam a mobilização de nutrientes que são cruciais ao desenvolvimento das plantas. Os valores de abundância bacteriana e fúngica obtidos são inferiores aos valores médios, o que poderá estar associado a um baixo teor em matéria orgânica dos solos, resultado do fraco coberto vegetal existente na ilha. Estes factos poderão eventualmente condicionar o sucesso da reflorestação.

REFERÊNCIAS

ALEXANDER, M.:

1991. Introduction to Soil Microbiology. John Wiley Sons, New York.

BALOWS, A., H. G. TRÜPER, M. DWORKIN, W. HARDER & U. H. SCHLEIFER:

1992. The prokaryotes. A handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification and Applications. 2nd ed.. New York. Springer Berlin Heidelberg.

DOMSCH, K. H.:

1993. Compendium of Soil Fungi. Die Deutsche Bibliothek, IHW – Verlag.

FERREIRA, W. F. C. & J. C. F. SOUSA:

1998. Microbiologia. Vol. 2. Lide – Edições Técnicas, Lda., Lousã.

FRANCO, E. P. C.:

1994. Carta de solos da ilha de Porto Santo. Centro de Estudos de Pedologia, Instituto de Investigação Científica e Tropical, D. R. A. Lisboa.

MOLITORIS, E., S. W. JOSEPH, M. I. KRICHEVSKY, W. SINDHUHARDJA
& R. R. COLWELL:

1985. Characterization and distribution of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Indonesia. *Applied and Environmental Microbiology*, **50** (6): 1388-1394.

NANNIPIERI, P., J. ARCHER, M. T. CECCHERINI, L. LANDI, G. PIETRAMELLARA
& G. RENELLA:

2003. Microbial Diversity and Soil Functions. *European Journal of Soil Science*, **54**: 665-670.

PELCZAR Jr., M. J., E. C. S. CHAN & N. R. KRIEG:

1986. Microbiology. 5th edition, Macgraw-Hill, New York.

PITT, J. I. & A. D. HOCKING:

1997. Fungi and Food Spoilage. 2nd edition, Blackie Academic Professional.

KRIEG, N. R. & J. G. HOLT:

1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Lippincott, Williams & Wilkins, Vol. 1. London.

RENAUD, F. N. R., M. DUTAUD, S. DAOUD, D. AUBEL, P. RIEGEL, D. MONGET & J. FRENEY:

1998. Differentiation of *Corynebacterium amycolatum*, *C. minutissimum* and *C. striatum* by carbon substrate Assimilations Tests. *Journal of Clinical Microbiology*, **36** (12): 3698-3702.

SAMSON, R. A. & E. S. Van REENEN-HOEKSTRA:

1988. Introduction to Food-Borne Fungi. 3th edition. Centraalbureau voor Schimmelcultures, The Netherlands.

SILVA, J. B. P.:

2003. Areia da Praia da Ilha de Porto Santo – Geologia, Génese, Dinâmica e Propriedades Justificativas do seu Interesse Nacional. Madeiras Rochas – Divulgações Científicas e Culturais.

TORSVIK, V., R. SORHEIM & J. GOKSOYR:

1996. Total Bacterial diversity in soil and Sediment Communities – a Review. *Journal of Industrial Microbiology*, **17**: 170-178.

VARENNE, A.:

2003. Produtividade de Solos e Ambiente. Escolar Editora.