

ATIVIDADE E FUNCIONALIDADE DAS COMUNIDADES
NITRIFICADORAS, DESNITRIFICADORAS E FIXADORAS DE
NITROGÊNIO EM SOLOS SOB DIFERENTES COBERTURAS
VEGETAIS NA REGIÃO NORTE DO ESTADO DO RIO DE
JANEIRO.

SIDY MACTAR NDAW

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO – 2007

ATIVIDADE E FUNCIONALIDADE DAS COMUNIDADES
NITRIFICADORAS, DESNITRIFICADORAS E FIXADORAS DE
NITROGÊNIO EM SOLOS SOB DIFERENTES COBERTURAS
VEGETAIS NA REGIÃO NORTE DO ESTADO DO RIO DE
JANEIRO.

SIDY MACTAR NDAW

Tese apresentada ao Centro de
Ciências e Tecnologias Agropecuárias da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte
das exigências para obtenção do título de
Doutor em Produção Vegetal.

Orientadora: Prof^a Emanuela Forestieri da Gama-Rodrigues.

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

MARÇO – 2007

ATIVIDADE E FUNCIONALIDADE DAS COMUNIDADES
NITRIFICADORAS, DESNITRIFICADORAS E FIXADORAS DE
NITROGÊNIO EM SOLOS SOB DIFERENTES COBERTURAS
VEGETAIS NA REGIÃO NORTE DO ESTADO DO RIO DE
JANEIRO.

SIDY MACTAR NDAW

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal.

Aprovada em Março de 2007.

Comissão examinadora:

Prof^a. Solange Silva Samarão (D. Sc., Biociências e Biotecnologia) – ISTCA.

Prof^a. Marta Simone Mendonça freitas (D. Sc., Produção Vegetal) – UENF.

Prof. Antônio Carlos da Gama-Rodrigues (D. Sc., Ciência do solo) – UENF

Prof^a Emanuela Forestieri da Gama-Rodrigues (Ph.D., Ciência do solo) – UENF

Orientadora

Ofereço aos meus pais Ousmane Ndaw ("in memoriam") e Oumou Kalsom Diouf, aos meus filhos, à minha família, aos meus amigos e à nossa terra.

“Transformar o medo em respeito, o respeito em confiança. Descobrir como é bom chegar quando se tem paciência. E para chegar onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de mais nada, querer”.

Amir Klink

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, pela presença divina em todos os momentos de minha vida e pela força espiritual a mim designada, para que eu pudesse concluir mais essa etapa rumo ao conhecimento científico.

Agradeço aos meus pais Ousmane Ndaw e Oumou Kalsom Diouf por todos os ensinamentos, amor, carinho e dedicação de sempre.

Meu reconhecimento:

Ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), pela oportunidade de realização do doutorado.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), que me concederam bolsas de doutorado pleno e doutorado sanduíche, respectivamente, sem as quais não teria sido possível a realização deste trabalho.

À Universidade “ Claude Bernard de Lyon I ” e ao Laboratório de Ecologia Microbiana, pelo apoio e por ter cedido suas instalações e material de consumo (reagentes) para execução de parte deste trabalho.

Aos meus filhos, meus maiores incentivos para continuar e concluir meus propósitos.

À Prof^a. Dra Emanuela Forestieri da Gama-Rodrigues pela orientação prestada durante todo o curso.

Ao Dr. Franck Poly, pela orientação amigável e, acima de tudo, pautada na verdadeira ética profissional.

Aos professores membros da banca examinadora, pelas críticas e sugestões apresentadas.

À técnica do Laboratório de Solos e Nutrição de Plantas, Kátia Regina Sales pela colaboração e amizade.

Aos amigos do CCTA, em especial à Maria Kellen, ao Zaia, ao Marius, à Gleícia e à Vanilda, pela amizade, convívio e apoio.

À Alessandra Pontirolli, ma petite amie, minha namorada, pelo incentivo, amor e carinho de sempre.

À Ana Paula da Silva, pelo apoio, amor e carinho de sempre.

Aos amigos do laboratório “ Ecologie Microbienne “ em especial ao Xavier Le Roux, à Claire, à Nadine, ao Dad, à Eleonore, à Joana e à My Dung pela recepção, convívio, troca constante de informações, amizade e apoio.

Aos familiares e aos amigos no Senegal, pelo apoio e estímulo que me ofereceram para realizar tamanho esforço, longe da companhia e do carinho deles.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	
GENERAL ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. Hipótese científica	4
3. Justificativa	5
4. Objetivo Geral	6
5. REVISÃO DE LITERATURA	8
5.1 Cordão da mata ou corredores de conservação	8
5.2 Grupos funcionais em ecossistemas terrestres	9
5.3 Metabolismo microbiano do ciclo de nitrogênio	12
5.3.1 Mineralização	13
5.3.2 Nitrificação	14
5.3.3 Desnitrificação	15
5.3.4 Fixação de nitrogênio	15
5.3.5 Reações de transformações biológicas do nitrogênio	17
5.4 Metodologias empregadas no estudo da diversidade microbiana	18
5.4.1 Extração de DNA de amostras ambientais	18
5.4.2 Reação de polimerização em cadeia (PCR)	18
5.4.3 DGGE (Eletroforese em gel contendo gradiente de desnaturantes)	20
5.5 Principais índices utilizados na mensuração da diversidade	21
5.5.1 Índice de Simpson	21
5.5.2 Índice de Shannon	22
5.5.3 Índice de Pielou	23
5.5.4 Índice de Margalef (DMg) e Menhinick (DMn)	23
5.5.5 Coeficiente de mistura de Jentsch (QM)	23
5.6 Indicadores microbiológicos de qualidade do solo	24
6. TRABALHOS	27
6.1 ATRIBUTOS QUÍMICOS E ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA EM SOLOS SOB DIFERENTES COBERTURAS VEGETAIS	28
RESUMO	28
ABSTRACT	30
6.1.1 INTRODUÇÃO	32
6.1.2 MATERIAL E MÉTODOS	35
6.1.2.1 Caracterização das áreas em estudo	35
6.1.2.2 Amostragens	35

6.1.2.3	Análises laboratoriais	36
6.1.2.3.1	Solos: atributos químicos e físicos	36
6.1.2.3.2	Serapilheira: atributos químicos	36
6.1.2.3.3	Respiração induzida pelo substrato (SIR)	37
6.1.2.3.4	Potencial de desnitrificação	37
6.1.2.3.5	Potencial de nitrificação	38
6.1.2.3.6	Potencial de fixação de nitrogênio	38
6.1.2.4	Análises estatísticas	39
6.1.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
6.1.4	CONCLUSÕES	52
6.1.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
6.2.	DIVERSIDADE ESTRUTURAL E FUNCIONAL DE MICROORGANISMOS EM SOLOS SOB DIFERENTES COBERTURAS VEGETAIS	63
	RESUMO	63
	ABSTRACT	65
6.2.1	INTRODUÇÃO	67
6.2.2	MATERIAL E MÉTODOS	69
6.2.2.1	Extração de DNA a partir das amostras de solo e serapilheira	69
6.2.2.2	Caracterização da comunidade total de bactérias	69
6.2.2.3	Identificação dos grupos de microrganismos responsáveis pela nitrificação do amônio no solo	71
6.2.2.4	Identificação dos grupos de microrganismos responsáveis pela desnitrificação do nitrato no solo	72
6.2.2.5	Análises estatísticas	72
6.2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
6.2.3.1	Diversidade genética e estrutura da comunidade total de bactérias nos compartimentos solo e serapilheira	74
6.2.3.1.1	Análise visual dos géis	74
6.2.3.1.2	Dendrograma obtido a partir da análise dos perfis de bandas 16S- DGGE da comunidade bacteriana total do solo e da serapilheira	81
6.2.3.2	Diversidade genética e estrutura das comunidades nitrificadoras nos compartimentos solo e serapilheira	85
6.2.3.2.1	Análise visual dos géis	85
6.2.3.2.2	Dendrograma obtido a partir da análise dos perfis de bandas AOB- DGGE das comunidades nitrificadoras do solo e da serapilheira	90
6.2.3.3	Diversidade genética e estrutura das comunidades desnitrificadoras nos compartimentos solo e serapilheira	95
6.2.3.3.1	Análise visual dos géis	95

6.2.3.3.2	Dendrograma obtido a partir da análise dos perfis de bandas NirK-DGGE das comunidades nitrificadoras do solo e da serapilheira _____	101
6.2.4	CONCLUSÕES _____	105
6.2.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	106
7.	CONCLUSÃO GERAL _____	112
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	114

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Transformações biológicas do nitrogênio _____	18
Tabela 2 - Seqüência dos iniciadores utilizados para a amplificação da comunidade total de bactérias _____	70
Tabela 3 - Seqüência dos iniciadores utilizados para a amplificação do β -Proteobacteria _____	71
Tabela 4 - Seqüência dos iniciadores utilizados para a amplificação de Eubacteria _____	71
Tabela 5 - Seqüência do grampo GC de 33 bases utilizadas nas análises de DGGE _____	72

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 – Análise química das amostras de solo coletadas nas diferentes coberturas estudadas _____	41
Quadro 2 – Regressões entre as atividades microbiológicas e as características químicas do solo e da serapilheira em quatro áreas sob diferentes coberturas vegetais _____	42
Quadro 3 – Análise da qualidade química e nutricional das amostras de serapilheira coletadas nas diferentes coberturas estudadas _____	51
Quadro 4 - Concentrações dos produtos de DNA extraídos a partir das amostras de solo e serapilheira _____	70
Quadro 5 - Padrões de bandas do DGGE-16S, comparando amostras de solo das diferentes coberturas vegetais _____	76
Quadro 6 - Padrões de bandas do DGGE-16S, comparando amostras de serapilheira das diferentes coberturas vegetais _____	78
Quadro 7 – Índices de diversidade dos perfis DGGE comunidade bacteriana total do solo e da serapilheira das diferentes coberturas estudadas de acordo com Shannon e com Simpson _____	80
Quadro 8 – Comparação dos perfis de bandas DGGE comunidade bacteriana total do solo e da serapilheira a partir das amostras coletadas em diferentes coberturas vegetais. ANOSIM _____	83
Quadro 9 – Equações de regressão linear simples entre os valores de estrutura da comunidade microbiana total e as características químicas do solo e da serapilheira _____	84
Quadro 10 - Padrão de bandas DGGE-AOB, comparando amostras de solo das diferentes coberturas vegetais _____	87
Quadro 11 - Padrão de bandas DGGE-AOB, comparando amostras de serapilheira das diferentes coberturas vegetais _____	88
Quadro 12 – Índices de diversidade dos perfis DGGE comunidades bacterianas nitrificadoras do solo e da serapilheira das diferentes coberturas estudadas de acordo com Shannon e com Simpson _____	90
Quadro 13 – Comparação dos perfis de bandas DGGE-AOB comunidades bacterianas nitrificadoras do solo e da serapilheira a partir das amostras coletadas em diferentes coberturas vegetais. ANOSIM _____	93
Quadro 14 – Equações de regressão linear simples entre os valores de estrutura das comunidades microbianas nitrificadoras e as características químicas do solo e da serapilheira _____	94
Quadro 15 - Padrão de bandas DGGE-NirK, comparando amostras de solo das diferentes coberturas vegetais _____	97
Quadro 16 - Padrão de bandas DGGE-NirK, comparando amostras de serapilheira das diferentes coberturas vegetais _____	99

Quadro 17 – Índices de diversidade dos perfis DGGE-NirK comunidades bacterianas desnitrificadoras do solo e da serapilheira das diferentes coberturas estudadas de acordo com Shannon e com Simpson _____	100
Quadro 18 – Comparação dos perfis de bandas DGGE-NirK comunidades bacterianas desnitrificadoras do solo e da serapilheira a partir das amostras coletadas em diferentes coberturas vegetais. ANOSIM _____	102
Quadro 19 – Equações de regressão linear simples entre os valores de estrutura das comunidades microbianas desnitrificadoras e as características químicas do solo e da serapilheira _____	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo do nitrogênio _____	12
Figura 2 – Evolução do CO ₂ da população microbiana de solos sob quatro diferentes coberturas vegetais _____	46
Figura 3 – Potencial de desnitrificação da população microbiana de solos sob quatro diferentes coberturas vegetais _____	46
Figura 4 – Potencial de nitrificação da população microbiana de solos sob quatro diferentes coberturas vegetais _____	46
Figura 5 – Potencial de fixação de nitrogênio da população microbiana de solos sob quatro diferentes coberturas vegetais _____	48
Figura 6 – Perfil de bandas obtido pela análise de DGGE dos fragmentos do DNAr 16S amplificados com primers 338f e 518r, comparando amostras de solo (A) e serapilheira (B) das quatro diferentes coberturas vegetais _____	75
Figura 7 – Dendrograma gerado através dos programas Gelcompar e Primer (Utilizando-se coeficiente de Person e método de análise cluster UPGMA) para analisar os perfis de bandas em experimento de amplificação dos genes de 16S ribossomal e PCR-DGGE das amostras de solo _____	82
Figura 8 – Dendrograma gerado através dos programas Gelcompar e Primer (Utilizando-se coeficiente de Person e método de análise cluster UPGMA) para analisar os perfis de bandas em experimento de amplificação dos genes de 16S ribossomal e PCR-DGGE das amostras de serapilheira _____	83
Figura 9 – Perfil de bandas obtido pela análise de DGGE dos fragmentos do gene AOB amplificado com o par de iniciadores CTO189f-GC e CTO654r e com os primers 357f-GC e 518r, comparando amostras de solo (A) e serapilheira (B) das quatro diferentes coberturas vegetais _____	86
Figura 10 – Dendrograma gerado através dos programas Gelcompar e Primer (Utilizando-se coeficiente de Person e método de análise cluster UPGMA) para analisar os perfis de bandas em experimento de amplificação do gene AOB e PCR-DGGE das amostras de solo _____	91
Figura 11 – Dendrograma gerado através dos programas Gelcompar e Primer (Utilizando-se coeficiente de Person e método de análise cluster UPGMA) para analisar os perfis de bandas em experimento de amplificação do gene AOB e PCR-DGGE das amostras de serapilheira _____	92
Figura 12 – Perfil de bandas obtido pela análise de DGGE dos fragmentos do gene NirK amplificados com primers 338f e 518r, comparando amostras de solo (A) e serapilheira (B) das quatro diferentes coberturas vegetais _____	96
Figura 13 – Dendrograma gerado através dos programas Gelcompar e Primer (Utilizando-se coeficiente de Person e método de análise cluster UPGMA) para analisar os perfis de bandas em experimento de amplificação do gene NirK e PCR-DGGE das amostras de solo _____	102
Figura 14 – Dendrograma gerado através dos programas Gelcompar e Primer (Utilizando-se coeficiente de Person e método de análise cluster UPGMA) para analisar os perfis de bandas em experimento de amplificação do gene NirK e PCR-DGGE das amostras de serapilheira _____	104

RESUMO

NDAW, SIDY MACTAR, D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, março de 2007. Atividade e funcionalidade das comunidades nitrificadoras, desnitrificadoras e fixadoras de nitrogênio em solos sob diferentes coberturas vegetais na região norte do Estado do Rio de Janeiro. Orientadora: Emanuela Forestieri da Gama-Rodrigues. Co-orientador: Franck Poly.

O solo é um recurso natural fundamental que contém uma vasta diversidade de microrganismos responsáveis pela decomposição da matéria orgânica e a ciclagem de nutrientes. Apesar das funções dos microrganismos no crescimento das plantas e na sustentabilidade dos ecossistemas, existem poucas informações acerca dos efeitos resultantes do manejo do solo, na ecologia microbiana. O objetivo deste trabalho foi estudar a influência da *Acacia auriculiformis* (acácia), *Mimosa caesalpiniaefolia* (sabiá), comparadas as coberturas da capoeira e pastagem sobre a atividade microbiológica, os atributos químicos do solo e a estrutura da comunidade microbiana total em áreas sob diferentes tipos de uso localizadas na Fazenda Carrapeta, Conceição de Macabú-RJ. Para tanto, coletaram-se quatro amostras

compostas de solo provenientes de quinze subamostras na profundidade de 0-10 cm, e quatro amostras simples de serapilheira, em cada área, em setembro de 2005. O potencial de mineralização do carbono do solo não diferiu entre as diferentes coberturas avaliadas. A qualidade orgânica e nutricional da serapilheira influenciou a atividade microbiológica do solo. As atividades nitrificadoras e desnitrificadoras foram maiores no solo sob capoeira, sendo significativamente influenciadas pelas concentrações de carbono orgânico, enquanto a atividade fixadora de nitrogênio foi maior nos solos sob acácia e sabiá. A acácia e o sabiá promoveram um aumento significativo da fertilidade do solo, sugerindo o plantio de leguminosas arbóreas, fixadoras de nitrogênio, como estratégia para reabilitação de áreas florestais com impacto antrópico. A capoeira apresentou o menor índice de diversidade bacteriana do solo em relação ao polimorfismo do 16S do DNAr devido, provavelmente, aos baixos teores de carbono e os possíveis efeitos sobre as estruturas das comunidades bacterianas decorrentes das atividades antrópicas nos demais solos. Os maiores valores de índices de diversidade da comunidade de bactérias desnitrificadoras da serapilheira foram encontrados na acácia e no sabiá estatisticamente iguais entre si e o menor valor na pastagem; a capoeira apresentou os valores intermediários, não diferindo com o sabiá. A análise de agrupamento com base no perfil dos géis de DGGE, mostrou efeitos diferenciais do tipo de coberturas vegetais sobre as estruturas genéticas das comunidades bacterianas. As estruturas genéticas da comunidade microbiana total do solo e da serapilheira foram expressivamente influenciadas pela qualidade química e nutricional da serapilheira e pela fertilidade do solo. Em relação às comunidades bacterianas nitrificadoras do solo, a capoeira e acácia apresentaram a mesma estrutura genética, indicando sucessão microbiana no solo sob esta leguminosa. Já para as estruturas das comunidades bacterianas desnitrificadoras do solo, necessita-se de mais estudos para elucidar o agrupamento da capoeira junto a pastagem. Os iniciadores usados neste trabalho para amplificar os genes *AOB* e *Nirk*, não produziram resultados com sensibilidade e especificidade suficientes para detectar as alterações das populações de bactérias nitrificadoras e desnitrificadoras da serapilheira.

Palavras chave: atividade microbiológica, diversidade microbiana, grupos funcionais, nitrificação, desnitrificação, fixação biológica de N₂.

ABSTRACT

NDAW, SIDY MACTAR, D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, march 2007. Activity and microbial functional groups (nitrifiers, denitrifiers and N₂ fixers) in areas under different soil management practices, located in north at Rio de Janeiro state. Advisor: Emanuela Forestieri da Gama-Rodrigues. Co-advisor: Franck Poly.

Soil is an important natural resource that contains a vast diversity of microorganisms, which are responsible for decomposition and nutrients cycling. Although microorganisms play an important role on soil sustainability and plants growth, few information is available about the effects of soil management on microbial ecology. The objective of this work was to study the influence of *Acacia auriculiformis* (acácia) and *Mimosa caesalpiniaefolia* (sabiá), in comparison to regenerating secondary forest (capoeira) and pasture on microbial activity, chemical attributes and genetic structures of the microbial communities in areas under different soil management located in Carrapeta farm, Conceição de Macabú-RJ. The soil (four replicate samples composed of fifteen sub-samples each, from a depth of 0-10 cm) and litter (four samples) were collected in September 2005. No significant differences in potential soil C

mineralization were found between areas. The nutritional and organic litter quality influenced the microbial activity. Potential nitrification and denitrification were significantly higher at capoeira than the other areas, being significantly influenced by the organic carbon concentration, while N₂ fixation values were the highest in the acácia and sabiá areas. This study indicated significant improvement of soil fertility in the soils under acácia and sabiá, suggesting that plantation of nitrogen-fixing legume trees is one method by which degraded forest sites can be restored. The soil under regenerating secondary forest showed the lowest bacterial diversity indexes in relation to the 16S DNAr, probably due to the lowest soil carbon contents and anthropical effects on bacterial community genetic structure in the other areas. The highest diversity indexes of denitrifiers were detected in the litter samples collected in legume trees (acácia and sabiá), while the pasture had the lowest value. The indexes values of capoeira and sabiá areas did not present significant differences. The analysis Plymouth Routine in Multivariate Ecological Research (*Primer*) revealed plant effects on microbial communities. The soil fertility, nutritional and organic litter quality influenced the genetic structure of the total bacterial community. In relation to nitrifiers, similar genetic structures were obtained among the soil samples collected in capoeira acácia areas, indicating bacterial succession in the reforested area with this legume tree. Already for the denitrifiers communities, more targeted studies are needed to elucidate the similar genetic structures between capoeira and pasture areas. The primers used in this study, targeting the AOB and NirK genes, showed low sensibility and specificity to detect the alterations of the nitrifiers and denitrifiers communities in the litter samples.

Keywords: microbial activity, microbial diversity, functional groups, nitrification, denitrification, biological nitrogen-fixing.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O crescimento explosivo da população mundial, agravado pelo aumento da capacidade do homem de alterar o meio ambiente, está acelerando o processo de degradação biótica e, conseqüentemente, a taxa de extinção de espécies. Este quadro tem sido razão de preocupação de diferentes segmentos da comunidade científica nacional e internacional que elegeram prioridades, para a conservação da biodiversidade dos ecossistemas mais ameaçados, como, por exemplo, as florestas tropicais.

No Brasil, a Mata Atlântica representa o ecossistema que mais sofreu com a interferência do homem. Em sua formação original, ela compreendia uma área superior a 1,3 milhões de km². Hoje, restam cerca de 5 a 8% da floresta original. Destes, a maior parte está fragmentada, sofrendo contínua perda de biomassa vegetal (Ecosistemas, 2001).

A fragmentação de habitats e a exploração excessiva dos recursos naturais são ameaças para a biodiversidade (Pimm *et al.* 1995, Pimm e Askins, 1995). Acredita-se que a perda da diversidade biológica pode levar a uma potencial ruptura do ciclo energético do ecossistema, uma vez que os processos ecológicos estão interligados e são interdependentes (Zak *et al.*, 1994). Os microrganismos representam a maior diversidade biológica e

fisiológica do solo e são responsáveis pelos processos ecológicos como a decomposição da matéria orgânica (acima de 95%) e a ciclagem de nutrientes. Além disso, a microbiota é conhecida por sua capacidade de recuperar formas de energia e nutrientes que outros organismos mais evoluídos, como os animais, não conseguem (Loreau, 2001). O nitrogênio é uma evidência dessa condição, pois, antes dos avanços industriais do século 20, sua disponibilidade no solo era basicamente dependente de microrganismos (Zilli *et al.*, 2003).

Os microrganismos do solo podem ser classificados em grupos funcionais de acordo com suas atuações nos processos biológicos do ecossistema. Exemplos desses grupos são os microrganismos envolvidos no ciclo do carbono (organismos heterotróficos) e os envolvidos no ciclo do nitrogênio, como os responsáveis pelos processos de nitrificação, desnitrificação e a fixação biológica de nitrogênio (Torsvik e Øvreås, 2002).

Poucos são os estudos feitos a respeito da importância da diversidade funcional das comunidades microbianas do solo sobre o funcionamento dos ecossistemas terrestres (Beare *et al.*, 1995; Moore *et al.*, 1995; Pankhurst *et al.*, 1996) e, não são bem definidos, os efeitos seletivos do tipo de cobertura morta na microbiota.

Segundo Cattelan *et al.* (1997), a diversidade florística é importante para a manutenção e o aumento da diversidade da biota do solo, fazendo com que o solo seja biologicamente mais ativo. Para Vargas e Scholles (2000), a diversidade vegetal altera a composição da comunidade microbiana, estimulando a biodiversidade. Bardgett e Wardle (2003) relatam que as espécies de pastagens têm efeitos, tanto estimulador como inibidor, na transformação de N no solo. Isto porque o padrão de resposta, quanto à atividade metabólica do solo, é fortemente influenciado pela composição dos resíduos orgânicos frescos adicionados ao solo. Sabe-se, entretanto, que espécies vegetais, que apresentam alta qualidade nutricional, proporcionam aumento na atividade e número de microrganismos, já que fornecem uma fonte de carbono e energia prontamente assimilável. Desse modo, pode-se medir a atividade microbiana pela quantidade de CO₂ liberado durante o processo respiratório.

A quantidade de CO₂ liberado ou de O₂ consumido pode dar uma boa idéia do comportamento da comunidade microbiana do solo, mas não pode permitir a avaliação de alterações qualitativas que porventura venham ocorrer.

Esta parece ser a maior limitação desta técnica, pois as comunidades de plantas não afetam de maneira uniforme todas as espécies de microorganismos do solo, podendo levar a drásticas alterações em algumas populações, mesmo que a liberação de CO₂ ou o consumo de O₂ não sejam sensivelmente afetados.

O uso da diversidade microbiana como indicador biológico de qualidade do solo é visto como a abordagem mais efetiva para a identificação, antes de se chegar a níveis críticos e irreversíveis, do uso inadequado da terra (Paoletti, 1999). Devido à grande sensibilidade dos microorganismos às interferências no ecossistema, a diversidade da comunidade pode revelar o equilíbrio entre os diversos organismos e os domínios funcionais no solo (Kennedy, 1999; Lavelle, 2000).

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de estudar a influência da *Acacia auriculiformis* (acácia), *Mimosa caesalpiniaefolia* (sabiá), comparadas as coberturas da capoeira e pastagem sobre a atividade microbiológica, os atributos químicos do solo e a estrutura da comunidade microbiana em áreas sob diferentes tipos de uso localizadas Fazenda Carrapeta, Conceição de Macabú-RJ.

2. HIPÓTESE CIENTÍFICA

É possível usar grupos funcionais de importância ecológica para detectar, com maior antecedência, os níveis de recuperação do solo após o estabelecimento de coberturas florestais.

3. JUSTIFICATIVA

A composição da comunidade de plantas pode influenciar na atividade e diversidade da comunidade microbiana devido à variabilidade na composição química dos exudatos liberados pelas espécies vegetais e na qualidade dos resíduos orgânicos depositados sobre o solo. Os microrganismos do solo são essenciais para a manutenção e funcionamento do mesmo, tanto em ambientes naturais quanto agrícolas, uma vez que estão relacionados a processos chave, como formação da estrutura do solo, decomposição de matéria orgânica e ciclos biogeoquímicos. Impactos antrópicos e, ou, diferentes tipos de manejo que resultam em diferentes níveis de estresses para as plantas, refletem na diversidade microbiana, que se torna então um indicador sensível capaz de alertar para as alterações que venham a ocorrer nas propriedades físicas e químicas do solo, que governam a ciclagem de nutrientes. A comparação de perfis de comunidades microbianas de áreas desmatadas e, ou, em recuperação, com áreas sem interferências antrópicas recentes, permite avaliar o comportamento e as alterações qualitativas das populações de microrganismos, visando subsidiar as ações de conservação, manejo e restauração destas áreas.

4. OBJETIVO GERAL

Estudar a influência da *Acacia auriculiformis* (acácia), *Mimosa caesalpiniaefolia* (sabiá), comparadas as coberturas da capoeira e pastagem sobre a atividade microbiológica, os atributos químicos do solo e a estrutura da comunidade microbiana em áreas sob diferentes tipos de uso localizadas Fazenda Carrapeta, Conceição de Macabú-RJ.

Objetivos específicos:

- Estudar em solo Latossolo Vermelho-Amarelo sob quatro diferentes coberturas vegetais a potencialidade de mineralização (SIR), nitrificação, desnitrificação e fixação biológica de nitrogênio.
- Utilizar a técnica de Eletroforese em Gel contendo Gradiente de Desnaturantes (DGGE) para estimar a estrutura genética da comunidade microbiana total e dos grupos de microrganismos responsáveis pelos processos de nitrificação e desnitrificação do nitrogênio, a partir de amostras de solos e serapilheira coletadas em áreas sob diferentes coberturas vegetais.

- Avaliar a influência das características químicas do solo e da serapilheira sobre a atividade microbológica do solo e a diversidade genética da comunidade microbiana do solo e da serapilheira.
- Interpretar as correlações existentes entre os atributos do solo e serapilheira visando a obtenção de indicadores da qualidade do solo.

5. REVISÃO DE LITERATURA

5.1. “Cordão da mata” ou corredores de conservação

O crescente aumento no processo de erosão genética observada nos últimos anos na maioria dos ecossistemas tropicais tem despertado um interesse cada vez maior no estudo da biodiversidade nesses ecossistemas. A floresta Atlântica é descrita como a mais antiga do Brasil, estabelecida há cerca de pelo menos 70.000.000 anos (Leitão Filho, 1987), cobrindo uma área de 100 a 120 milhões de ha. Atualmente, a cobertura desta vegetação está reduzida a cerca de 5 a 8% da floresta original. Na região Norte Fluminense, os impactos resultantes da exploração humana são ainda mais graves. O desmatamento, o uso regular de fogo e a mecanização resultaram numa drástica redução do maciço florestal e, também, num elevado grau de degradação dos solos.

Este cenário vem sendo modificado nos últimos anos através de técnicas ecológicas caracterizadas pela preocupação com a conservação de solos, como é o caso dos projetos corredores de conservação também chamados de “corredores ecológicos” ou “cordão de mata”. O “corredor ecológico” compreende uma rede de parques, reservas e outras áreas de uso menos intensivo, que são gerenciadas de maneira integrada para garantir a sobrevivência do maior número possível de espécies de uma região. Uma

importante característica do corredor de conservação é a de que, ao promover o contato entre dois fragmentos isolados, causa a dispersão de indivíduos de diferentes populações de uma área para a outra, permitindo o fluxo gênico e a colonização por espécies, em cada uma das áreas (Primack, 1993).

O plantio de espécies arbóreas constitui-se numa valiosa técnica, tanto de recuperação das terras degradadas, quanto pelo aumento do potencial de regeneração natural dos fragmentos da Mata Atlântica e sua biodiversidade, por exercer efeitos diretos e indiretos sobre as características do solo, mediante a reciclagem dos nutrientes e as interações delas com o microambiente. É de se esperar que a inclusão de componentes arbóreos também favoreça a adição de matéria orgânica, nutrientes e água que normalmente aumentam a biomassa e a atividade dos microrganismos do solo. As leguminosas fixadoras de N, por exemplo, fornecem um material formador de serapilheira rico em N que, além de melhorar a fertilidade do solo, serve de substrato para melhorar a estruturação e as propriedades biológicas do solo. As alterações nas condições químicas e físicas do solo podem exercer significativas modificações na qualidade e na quantidade da matéria orgânica, influenciando na sobrevivência de microrganismos celulolíticos, diazotróficos, amonificadoras, nitrificadoras e desnitrificadoras (Kennedy, 1999).

A microbiota do solo tem sido considerada um dos mais sensíveis e úteis marcadores biológicos para classificar sistemas agrícolas e, ou, florestais sob distúrbios antrópicos (Turco e Blume, 1998; Kennedy, 1999; Rogers e Tate III, 2001).

O estudo da dinâmica das comunidades microbianas é de importância fundamental para a compreensão dos processos funcionais, tais como a produção de matéria orgânica e a ciclagem de nutrientes, uma vez que a maioria das importantes transformações dos ciclos biogeoquímicos são mediadas pelos microrganismos.

5.2. Grupos funcionais em Ecossistemas Terrestres

Um ecossistema é um sistema funcional de relações complementares entre os organismos vivos e o seu ambiente, ocorrendo uma regulação interna de fluxos de energia que mantém um equilíbrio dinâmico e estável. Todos os ecossistemas terrestres dependem da ação de microrganismos para seu funcionamento e manutenção. Um ecossistema natural difere,

fundamentalmente, de um ecossistema que tem a intervenção do homem para a produção de alimento e outros elementos de alto valor comercial. Num ecossistema natural a regulação do funcionamento é basicamente um produto da biodiversidade que controla o fluxo de energia (Swift e Anderson, 1993).

A diversidade funcional é um conceito de grande importância quando se tem como meta avaliar a diversidade biológica de microrganismos em ecossistemas terrestres. Os microrganismos podem ser classificados em grupos funcionais, que refletem sua atuação em um ou mais processos biológicos dos ecossistemas. Exemplos destes são os microrganismos envolvidos no ciclo do nitrogênio, como os responsáveis pela fixação biológica de nitrogênio e os processos de nitrificação e desnitrificação; e os microrganismos associados ao ciclo do carbono, como aqueles que produzem enzimas extracelulares específicas (ligno-celulolíticos) para degradar os polímeros complexos de lignina e celulose (Torsvik e Ovreas, 2002).

A resistência à decomposição de diferentes componentes da planta irá depender também da proporção de diferentes grupos de organismos que habitam o solo e, conseqüentemente, de suas condições ecológicas (Orlov, 1995). Por exemplo, durante a degradação da serapilheira, atuam centenas de espécies de fungos e bactérias com diferentes especializações.

Entre os fungos, os mais eficientes e mais estudados são *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete versicolor* e o *Phanerochaete chrysosporium*, sendo este último exemplo típico de decompositor da lignina. Estes fungos degradam tanto a lignina quanto à celulose. Segundo Mendonça e Loures (1996), os fungos são excelentes decompositores de lignina em solos argilosos. Bactérias como *Bacillus*, *Streptomyces* e *Nocardia*, degradam complexos ligno-celulolíticos, atribuindo-se também esta ação a outras linhagens de *Flavobacterium*, *Pseudomonas* e *Aeromonas*. Algumas bactérias aeróbicas, como *Azotobacter* e *Pseudomonas*, reduzem o peso molecular da lignina.

Considerada fonte de energia de qualidade intermediária, a celulose é decomposta no solo pela ação de enzimas (celulases) produzidas por uma vasta e diversa população microbiana. São vários os gêneros de microrganismos capazes de usar a celulose como fonte de carbono. Entre os fungos encontram-se *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Myrothecium*, *Penicillium*, *Polyporus*, *Rhizopus*, entre outros. Entre as bactérias temos *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas* e *Vibrio*,

e, no grupo dos actinomicetos, encontramos *Micromonospora*, *Nocardia* e *Streptomyces* (Alexander, 1977 *apud* De-Polli *et al.*, 1988). Segundo Kögel-Knabner (2002), em condições anaeróbicas, predomina a decomposição da celulose através de grupos particulares de bactérias.

A hidrólise da celulose, substrato orgânico mais abundante incorporado ao solo (30 a 60% dos resíduos vegetais), é feita por microrganismos celulolíticos e a quantificação dos mesmos dá indicação do processo de mineralização de substratos orgânicos e do ciclo do C no solo (Cerri *et al.*, 1992).

Os microrganismos são importantes na formação da estrutura do solo, através da formação de húmus e agregados, principalmente fungos filamentosos e actinomicetos. Estes agregados são estabilizados pela produção de gomas por bactérias (Gupta e Germida, 1988). A textura também exerce uma forte influência sobre a biodiversidade do solo. Segundo Hassink (1994), o tamanho da biomassa e os teores de C e N mineralizados por unidade de biomassa são dependentes da textura do solo.

A diversidade biológica dos microrganismos heterotróficos pode ser classificada de acordo com os seguintes grandes grupos:

Bactérias de vida livre: responsáveis pela imobilização e mineralização de nutrientes, principalmente, N, P e S. Este grupo promove o crescimento das plantas, a síntese de substâncias húmicas e a agregação do solo, assim como a degradação de agroquímicos e xenobióticos.

Rizóbios: grupo especializado de microrganismos responsáveis pela fixação biológica de nitrogênio atmosférico.

Fungos não-micorrízicos: imobilização e mineralização de nutrientes, principalmente, N, P e S; promovem a redistribuição de nutrientes e o condicionamento de detritos; são, também, responsáveis pela agregação do solo e pela decomposição de agroquímicos e xenobióticos.

Fungos micorrízicos: são várias, as vantagens decorrentes da simbiose deste grupo de fungos com as plantas. As mais importantes são: intermediação do transporte de elementos essenciais e água do solo para as raízes; intermediação do movimento entre plantas de elementos essenciais e carboidratos; regulação do processo de fotossíntese das plantas.

5.3. Metabolismo microbiano do ciclo de nitrogênio

O nitrogênio é encontrado em abundância na litosfera, onde ocorre nas rochas, no fundo dos oceanos e sedimentos, representando 98% do N terrestre. No solo, o N encontra-se distribuído em vários compartimentos, sendo que do total do N orgânico terrestre, 96% estão na matéria orgânica morta e 4%, nos organismos vivos. O N da matéria viva encontra-se predominantemente nas plantas (94%), 4% na microbiota e 2% nos animais (Moreira e Siqueira, 2002). Na atmosfera, o N ocorre na forma do gás N_2 , constituindo 78,1% do seu volume total.

O nitrogênio é o componente essencial dos aminoácidos dos [ácidos nucléicos](#), vitais para os seres vivos. A deficiência de nitrogênio utilizável constitui, muitas vezes, o principal fator limitante do crescimento vegetal. As plantas, com exceção das leguminosas e de outras espécies vegetais capazes de aproveitar o nitrogênio diretamente da atmosfera, em associação com microrganismos, absorvem o nitrogênio mineral, principalmente nas formas amoniacais (NH_4^+) e nítricas (NO_3^-); enquanto no solo predomina a forma orgânica ($RCOOHNH_2$), o que implica necessariamente na ocorrência de muitas transformações. A maioria das transformações sofridas pelo nitrogênio na biosfera (figura 1) é de origem microbiana (*bactérias de vida livre e fungos não-micorrizicos*).

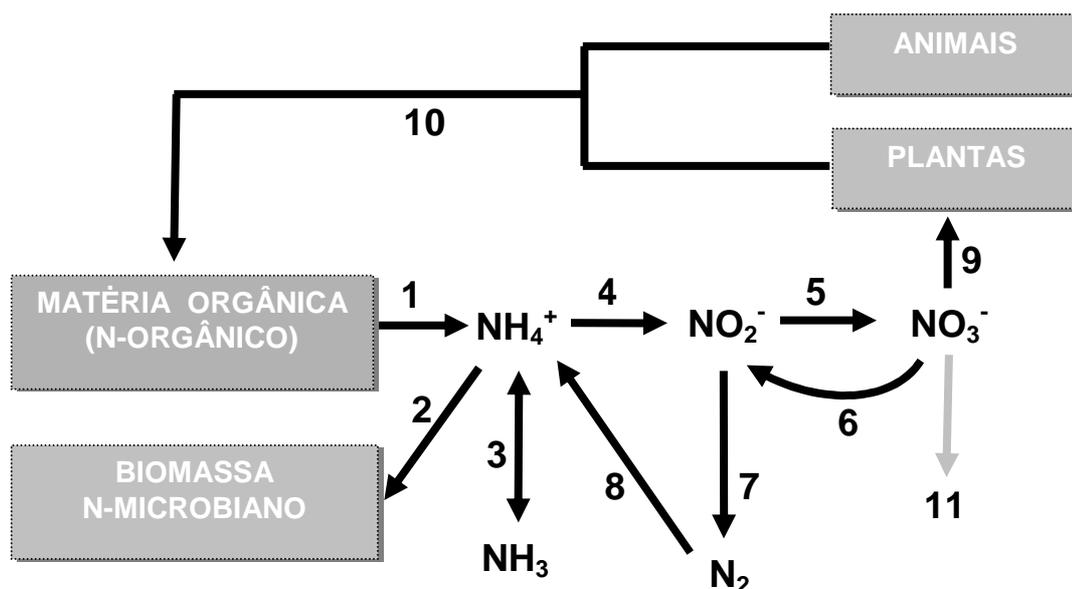


Figura 1 : Ciclo do nitrogênio

1. Mineralização (Amonificação); 2. Imobilização (Assimilação); 3. Equilíbrio químico (dependente do pH); 4,5. Nitrificação; 6,7. Desnitrificação; 8. Fixação; 9. Imobilização (Redução Assimilativa-Plantas); 10. Decomposição e complexação;

O nitrogênio mineral (NH_4^+ e NO_3^-) representa apenas de 1% a 2% do nitrogênio total no solo. Estas duas formas de N são produzidas a partir da mineralização do nitrogênio orgânico, sendo essas duas formas de N mineral extremamente dinâmicas no solo (Vale *et al.*, 1993).

5.3.1 Mineralização

A mineralização do N no solo refere-se ao processo de conversão do N-orgânico a NH_4^+ . A principal fonte de N do solo é a matéria orgânica do solo, que apresenta o N na forma de RCOOHNH_2 , formando complexos orgânicos tais como proteínas, aminoácidos, ácidos nucléicos e nucleotídeos. Estes compostos nitrogenados são, em geral, rapidamente decompostos em substâncias mais simples por organismos que vivem nos solos. Nesse caso, quanto maior o potencial produtivo de biomassa do ecossistema, maior é o aporte de matéria orgânica do solo, conseqüentemente, maior a quantidade de N mineralizado.

É conveniente ressaltar que grande parte do nitrogênio encontrado no solo, provem de tecidos microbianos. As bactérias saprófitas e várias espécies de fungos, principais responsáveis pela decomposição de materiais orgânicos mortos, utilizam as proteínas e os aminoácidos como fonte para suas próprias proteínas e liberam o excesso de nitrogênio sob a forma de amônio (NH_4^+).

A mineralização resulta de interações que envolvem substratos heterogêneos, funcionalidade e diversidade de organismos, textura e estrutura do solo, pH e fertilidade do solo. Condições ambientais, tais como baixa temperatura ou baixo potencial de água no solo, reduzem a atividade microbiana e, portanto, reduzem as taxas de mineralização. As alterações de manejo também exercem significativas modificações na qualidade e na quantidade da matéria orgânica, na quantidade e nas formas de N no solo e no processo de mineralização de N. Bonito *et al.* (2002) relatam que a maioria do N disponível na camada da serapilheira é reciclada rapidamente pelos microrganismos, enquanto o N mais recalcitrante e o N diretamente assimilado atuam como moléculas básicas para a síntese da matéria humificada no solo, da qual o N mineral é liberado. Segundo Stevenson (1986), a dinâmica das reações e as inter-relações entre os constituintes orgânicos são asseguradas por seis fatores: resíduos de plantas ou animais; biomassa do solo; compostos

solúveis; enzimas ligadas ou livres; componente do húmus fração lábil e componente húmus fração recalcitrante.

5.3.2 Nitrificação

A nitrificação refere-se à oxidação dos íons amônio (NH_4^+), provenientes da amonificação, para nitrato (NO_3^-). O processo de nitrificação ocorre amplamente no grupo das bactérias nitrificantes. Essas bactérias são organismos quimiotróficos e utilizam a energia da oxidação do amônio para fixar gás carbônico. O processo de nitrificação se realiza em dois passos seqüenciais: a nitritação através da ação bioquímica de bactérias do gênero *Nitrossomonas* e a nitratação mediada por bactérias do gênero *Nitrobacter*. Sendo que o nitrito (NO_2^-), produto intermediário neste processo raramente acumula-se em concentrações detectáveis. A nitrificação é um bom indicador da atividade biológica e da fertilidade do solo. É um processo sensível às alterações do ambiente, e pode ser medido com razoável precisão (López *et al.*, 1998).

A viabilização do processo de nitrificação em níveis adequados exige condições ambientais bem definidas. De acordo com Rustead *et al.* (2000) e Ekblad e Hogberg (2001), há uma correlação estreita entre a temperatura do solo e a atividade respiratória dos microrganismos. A atividade dos nitrificadores é beneficiada quando a temperatura situa-se na faixa entre 25 a 30°C. A intensidade da nitrificação é maior quando o pH em H_2O é próximo da neutralidade. Embora a nitrificação seja beneficiada por valores de pH próximos da neutralidade, o processo é acidófilo, particularmente na primeira fase da nitrificação. A calagem eleva o pH, que estimula as atividades das bactérias nitrificadoras, responsáveis junto com os fertilizantes nitrogenados pela reacidificação do solo. A umidade do solo influencia grandemente as atividades microbiológicas. As bactérias nitrificadoras são mais exigentes, paralisando suas atividades quando a tensão da água no solo aproxima-se do nível de 15 atm (Serrana, 2000).

Além das condições ambientais abordadas, as comunidades de plantas formadoras de serapilheira influenciam as atividades heterotróficas do solo e conseqüentemente a dinâmica do nitrogênio. Na presença de resíduos vegetais com relação C/N maior que 30, o processo de nitrificação é reduzido

drasticamente devido ao estímulo à imobilização do N-mineral (Palm *et al.*, 2001).

5.3.3 Desnitrificação

A desnitrificação é a transformação do nitrato (NO_3^-), ou do nitrito (NO_2^-), em produtos gasosos: monóxido de N (NO), óxido nitroso (N_2O) e, em seguida, em nitrogênio molecular (N_2). O processo de desnitrificação é comum a algumas bactérias, como os gêneros *Pseudomonas*, *Micrococcus* e *Thiobacillus* (Zumft, 1999). A desnitrificação permite a transferência do N da biosfera para a atmosfera. Além de causar perda do N disponível para a planta, o processo de desnitrificação tem uma função ambiental essencial: ele limita a lixiviação dos nitratos em direção ao lençol freático e, também, produz N_2O envolvido na destruição da camada de ozônio e no aumento do efeito estufa (Crutzen, 1981; Braker *et al.*, 1998; Scala e Kerkhof, 1998; Priemé *et al.*, 2002). Neste ponto de vista, a desnitrificação é considerada como um processo de regulação no ciclo de N.

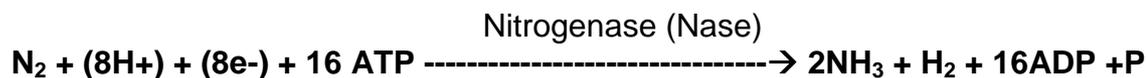
O requisito do processo de desnitrificação é o baixo nível de oxigênio dissolvido disponível no meio, de tal forma que as bactérias utilizam o oxigênio do N- NO_3 e do N- NO_2 para respiração, ao invés do oxigênio do ar (Von Sperling, 2002). Acima de 1,0 mg/L de oxigênio dissolvido, a desnitrificação é inibida pela maior facilidade de utilização do O_2 . A presença de oxigênio livre pode inibir a atividade do sistema enzimático necessário à desnitrificação. A alcalinidade produzida durante a conversão do nitrato a gás nitrogênio resulta em um aumento do pH. O pH ótimo situa-se entre 7 e 8, podendo variar para as diferentes populações bacterianas. A temperatura afeta a taxa de remoção de nitrato e a taxa de crescimento microbiano. Os organismos são sensíveis às mudanças na temperatura (Ilies e Mavinic, 2000).

5.3.4 Fixação de nitrogênio

O processo de fixação de nitrogênio é definido como sendo a conversão do nitrogênio molecular (N_2) em amônia ($\text{N}_2 \rightarrow 2\text{NH}_3$). Essa reação é dependente da atividade da nitrogenase, a qual catalisa a conversão do nitrogênio atmosférico a amônia. Existem, na natureza, três grandes sistemas fixadores: vida livre (microrganismos organotróficos (dependentes de fonte de carbono orgânico) ou fotossintéticos aeróbios, facultativos e anaeróbios), associativo (a superfície dos tecidos de plantas constitui um habitat com fonte

de carbono e umidade para alguns tipos de microrganismos diazotróficos que, além de promover a fixação de nitrogênio, podem secretar hormônios de crescimento e desenvolvimento da planta) e mutualístico (interdependência entre plantas e bactérias, com formação de estruturas especializadas como, por exemplo, a simbiose entre o rizóbio e as leguminosas).

A fixação biológica de nitrogênio é um importante componente do ciclo deste elemento, pois reabastece a biosfera de nitrogênio e compensa a sua perda devido à desnitrificação (Postgate, 1987). A maioria dos seres vivos não é capaz de utilizar o nitrogênio atmosférico (N₂) para sintetizar proteínas e outras substâncias orgânicas. A fixação biológica do nitrogênio é a capacidade de alguns organismos, denominados diazotróficos, de utilizarem diretamente o dinitrogênio atmosférico como fonte de nitrogênio para o seu crescimento :



A interação simbólica leguminosa-rizóbio é sensível aos extremos de temperatura, sendo que temperaturas baixas retardam a infecção e a formação de nódulos (Franco e Dobereiner, 1994). De maneira geral, a temperatura na faixa de 25 a 35°C favorece a nodulação. Em solos com pH muito alto, ocorre um aumento considerável na proporção de actinomicetos no solo, organismos produtores de antibióticos que podem inibir o estabelecimento do rodízio (Franco e Dobereiner, 1988). Nas associações leguminosa-rizóbio a deficiência de unidade diminui a infecção dos pêlos absorventes e o crescimento dos nódulos.

As bactérias não simbióticas dos gêneros *Azotobacter* e *Clostridium* são capazes de fixar o nitrogênio. *Azotobacter* é aeróbico, ao passo que *Clostridium* é anaeróbico; ambas são bactérias saprófitas comuns, encontradas no solo. Calcula-se que elas fornecem, provavelmente, cerca de 7 quilogramas de nitrogênio por hectare de solo por ano. Outro grupo importante inclui muitas bactérias fotossintéticas. As algas azuis de vida livre desempenham, também, um papel importante na fixação do nitrogênio. Elas são cruciais para o cultivo do arroz, que constitui a principal dieta de mais da metade da população mundial. As algas azuis podem desempenhar, também, um importante papel ecológico na fixação do nitrogênio nos oceanos (Vidotti e Rollemberg, 2004).

5.3.5 Reações de transformações biológicas do nitrogênio

As reações de transformação biológica do nitrogênio envolvem um sistema enzimático bastante variado, que em algumas vias é bem elucidado, embora em outras seja, ainda, pouco conhecido.

A atividade enzimática do solo resulta, principalmente, da ação de enzimas extracelulares produzidas pelos microrganismos, fungos e bactérias, podendo ser encontradas em plantas, animais, restos celulares, livres ou associadas com componentes do solo (Moreira e Siqueira, 2002). Enzimas são proteínas que catalisam reações específicas. Elas têm participação essencial nos ciclos dos elementos no solo e as mais importantes são aquelas diretamente ligadas à biodegradação de macromoléculas orgânicas (Joshi *et al.*, 1993; Sinsabaugh *et al.*, 1994; Dilly e Munch, 1996).

Na assimilação de N pelas plantas, o nitrato (NO_3^-) é convertido em amônio (NH_4^+) por enzimas denominadas genericamente de redutases. E nos processos de denitrificação ou volatilização, processo no qual os microrganismos heterotróficos utilizam o nitrato como acceptor final de elétrons, as enzimas envolvidas são também denominadas redutases. Uma vez absorvido pela célula, o nitrato é reduzido a nitrito pela redutase do nitrato (RN) e, em seguida, a amônio, pela redutase do nitrito (RNI). Estas primeiras transformações nesta sequência de eventos são semelhantes nos dois processos (assimilação e denitrificação). As óxido nítrico redutase e óxido nitroso redutase são outras enzimas que participam no processo de denitrificação de N (Shrestha *et al.*, 2001; Philippot *et al.*, 2002).

A nitrogensase é um complexo enzimático responsável pela fixação biológica de nitrogênio (redução do N_2 até NH_3), encontrado apenas nos diazotróficos (Moreira e Siqueira, 2002).

Os possíveis caminhos para obtenção de energia e as enzimas envolvidas estão relacionados com a adaptação e sobrevivência destes microrganismos sob uma variedade de condições ambientais (Ye e Thomas, 2001). Na tabela 1, estão representadas a estequiometria dos processos de transformação biológica do nitrogênio (reações e produtos) e a variação de energia livre envolvida.

Tabela 1: Transformações biológicas do nitrogênio

Processos, Reações e Produtos	ΔG^0 , (kJ.mol ⁻¹)
Fixação do Nitrogênio	
1) $0,5N_2 + 1,5H_2 + H^+ \rightarrow NH_4^+$	-39,4
Nitrificação convencional	
2) $NH_4^+ + 1,5O_2 \rightarrow NO_2^- + 2H^+ + H_2O$	-290,4
3) $NO_2^- + 0,5O_2 \rightarrow NO_3^-$	-72,1
Desnitrificação convencional	
4) $NO_3^- + 1,25\{CH_2O\} + H^+ \rightarrow 0,5N_2 + 1,75H_2O + 1,25CO_2$	-594,6
Desnitrificação Autotrófica	
5) $3NO_3^- + 5NH_4^+ \rightarrow 4N_2 + 9H_2O + 2H^+$	-297
Anammox	
6) $NO_2^- + NH_4^+ \rightarrow N_2 + H_2O$	-358

Fonte: Jetten *et al.*, 1999; Sliemers *et al.*, 2002; Jetten *et al.*, 2003.

5.4. Metodologias empregadas no estudo da diversidade microbiana

5.4.1 Extração de DNA de amostras ambientais

Para a busca de polimorfismo de DNA, faz-se necessária a extração do DNA genômico. Vários procedimentos de extração de DNA de microorganismos têm sido descritos na literatura (Ogram *et al.*, 1987; Smalla *et al.*, 1993; Akkermans *et al.*, 1995; Van Elsas *et al.*, 1997). O que se observa em geral é que protocolos padrões são utilizados com algumas modificações, visando resolver os problemas específicos da espécie em estudo.

A escolha de um protocolo de extração depende do material a ser processado, bem como a aplicação do ácido nucléico, que vai exigir diferentes graus de pureza (Melo e Valadares, 1998). O sucesso na extração de ácidos nucléicos a partir de amostras de solo, por exemplo, vai requerer o emprego de colunas específicas para a otimização das etapas de extração e purificação das amostras de DNA total quando o solo contém grande quantidade de matéria orgânica, que contamina o DNA e inibe a reação da polimerase em cadeia (Trevors, 1996; O'Donnell e Görres 1999).

5.4.2 Reação de polimerase em cadeia (PCR)

Nenhuma tecnologia, nos últimos anos, provocou um impacto tão profundo no estudo de ecologia microbiana quanto o PCR (reação da polimerase em cadeia). A técnica de PCR, inicialmente descrita por Mullis e

Faloon (1987), permite obter *in vitro* várias cópias de um determinado segmento de DNA. Esta metodologia tem permitido o desenvolvimento de protocolos altamente sensíveis e específicos para a detecção e/ou quantificação de microrganismos, plasmídios ou genes (Saiki *et al.*, 1998; Rosado *et al.*, 1996).

A técnica de PCR é desenvolvida com o intuito de amplificar seqüências conhecidas. A seqüência alvo mais utilizada para o estudo da comunidade bacteriana total é o gene rRNA 16S. Essas moléculas do rRNA são consideradas importantes para estudos de ecologia microbiana, porque estão presentes e com a mesma função em todos os organismos, derivam de um ancestral comum e parecem ser geneticamente estáveis. Ao mesmo tempo, são altamente conservadas em algumas regiões e variáveis em outras, contém grande número de informações nas seqüências devido ao tamanho da molécula, apresentam domínios independentes podendo ser discriminadas de outras moléculas e apresentam grande número de seqüências disponíveis em base de dados (Rosado *et al.*, 1997). A maioria dos estudos de Ecologia Microbiana Molecular está concentrada no 16S rRNA, devido a disponibilidade das seqüências em bancos de dados para efeito comparativo.

A reação de PCR baseia-se no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos sintéticos (pequenas moléculas de DNA de fita simples), utilizados como iniciadores (“primers”). Estes iniciadores ligam-se em dois extremos opostos da fita de DNA que serve como molde, havendo, então, expansão a partir desses, através da ação da DNA polimerase termo-estável, Taq polimerase, isolada originalmente do microrganismo *Thermus aquaticus*. A amplificação envolve repetições cíclicas de altas temperaturas necessárias para a denaturação (92 a 94° C), seguidas de uma temperatura mais baixa para possibilitar o anelamento dos iniciadores (37 e 60° C) e uma temperatura intermediária (usualmente 72° C) que permite a extensão da cópia da fita de DNA, a partir do ponto de ligação dos iniciadores (Saiki *et al.*, 1998).

Com a PCR, após cerca de 30 ciclos de amplificação e menos de 2 horas, a quantidade de DNA alvo é aumentada milhares de vezes, e, após a separação dos produtos por eletroforese em gel e coloração adequada, estes podem ser visualizados a olho nu.

As máquinas utilizadas para performance dessas reações de amplificação são automatizadas e chamadas reatores térmicos ou

termocicladores e podem ser programadas para aquecimentos e resfriamentos cíclicos, e os modelos mais modernos contam com uma maior eficiência na mudança de temperaturas (Ferreira e Grattapaglia, 1995).

5.4.3 DGGE (Eletroforese em gel contendo gradiente de desnaturantes)

A técnica de DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) é usada para separar fragmentos de DNA de mesmo tamanho, mas com seqüências de bases nucleotídicas diferentes. Originalmente, foi desenvolvida para detectar mutações específicas no genoma humano, mas vem sendo aplicada em ecologia microbiana para determinar a diversidade genética de comunidades microbianas (Muyzer *et al.*, 1993), estudo de estrutura genética de grupos funcionais (Griffiths *et al.*, 1999), distribuição espacial de população de bactérias e estudo de impacto ambiental na comunidade do solo (Engelen *et al.*, 1998).

Esta técnica utiliza géis de poliacrilamida contendo um gradiente linear de desnaturação (uréia e formamida), nos quais moléculas de DNA com o mesmo tamanho, porém com diferentes seqüências, apresentam perfis migratórios diferentes. As variações na composição de nucleotídeos dos diferentes segmentos de DNA determinam seu comportamento de migração em posições diferentes (Muyzer, 1999). O comportamento de migração do fragmento de DNA no DGGE é governado não apenas pela composição dos nucleotídeos (conteúdo de G+C), mas também pelas interações entre estes dentro da molécula (Breslauer *et al.*, 1986; Sugimoto *et al.*, 1996). As bandas do DNA nos géis de DGGE podem ser visualizadas após coloração com brometo de etídio, prata ou Syber Green I.

O DNA presente no gel de DGGE pode ser transferido para membranas de náilon e hibridizado com sondas específicas para determinados grupos microbianos, ou as bandas de PCR podem ser eluídas do gel, reamplificadas e seqüenciadas para permitir o posicionamento filogenético dos membros da comunidade (Heuer e Smalla, 1997; Muyzer e Smalla, 1998).

Usando-se DGGE, pode-se detectar aproximadamente 50% das variações de seqüências em fragmentos de DNA com até 500 pares de bases (Myers *et al.*, 1985). Essa porcentagem pode ser aumentada para quase 100% quando se acrescenta a um dos lados do fragmento de DNA um segmento rico em GC (grampo de GC). Esse grampo de GC, quando anexado à extremidade

5' de um dos iniciadores, é amplificado por PCR juntamente com o DNA e introduzido no fragmento de DNA amplificado (Sheffield *et al.*, 1989), agindo como um domínio de alta resistência à desnaturação, que impede a dissociação das duas fitas do DNA em fitas simples. Normalmente, o comprimento do grampo de GC varia entre 30 e 50 nucleotídeos (Muyzer *et al.*, 1998)

5.5. Principais índices utilizados na mensuração da diversidade

A diversidade, ou biodiversidade, é um atributo das comunidades biológicas que deve ser estimado para que possamos compará-las com outras comunidades. O conceito de diversidade de espécie pode ser avaliado por meio de dois componentes: (1) riqueza das espécies, baseada no número total de espécies presentes, e (2) uniformidade, baseada na abundância relativa de espécies e no grau de dominância (Odum, 1988). Ao longo do desenvolvimento da ciência, vários índices têm sido propostos, tais como Simpson (1949), Margalef (1958), Shannon e Weaver (1949), para o estudo do comportamento da diversidade de comunidades diferentes, permitindo uma avaliação da dinâmica populacional frente a diferentes manejos. Os principais índices utilizados na mensuração da diversidade são:

5.5.1 Índice de Simpson

O primeiro índice desenvolvido para mensurar a diversidade foi o índice de Simpson. Este é um índice de dominância que sugere que a diversidade é inversamente relacionada à probabilidade de que dois indivíduos tomados, ao acaso, em uma comunidade pertençam à mesma espécie. O seu valor oscila de 0 a 1 e quanto mais alto for, maior a probabilidade de os indivíduos serem da mesma espécie, ou seja, maior a dominância e menor a diversidade.

O índice de Simpson dá uma importância relativamente pequena às espécies raras, e uma maior importância às espécies comuns. É calculado como:

$$C = \sum_{i=1}^s p_i^2 = \sum_{i=1}^s \left(\frac{N_i}{N} \right)^2 \quad (\text{Dominância})$$

$$1 - C = 1 - \sum_{i=1}^s \left(\frac{N_i}{N} \right)^2 \quad (\text{Diversidade})$$

onde $pi = \frac{Ni}{N}$ = proporção de cada uma das espécies i (i variando de 1 a S);
 S = riqueza ou nº de espécies;

$$N = \sum_{i=1}^S N_i = \text{quantidade (n}^\circ \text{ de ocorrência, n}^\circ \text{ de indivíduos, biomassa) total.}$$

5.5.2 Índice de Shannon

O índice mais usado em toda a literatura ecológica é, sem dúvida nenhuma, o índice de Shannon. Este índice começa a causar polêmica pelo seu nome: alguns autores o chamam de Shannon-Wiener, outros de Shannon-Weaver. Isto porque a função foi desenvolvida independentemente por dois pesquisadores: Shannon e Wiener. Porém, o primeiro autor trabalhava com outro, chamado Weaver. A forma mais correta, segundo Krebs (1985), é Shannon-Wiener.

Este índice permeou a literatura ecológica nas décadas de 60 e 70, e é baseado na teoria da informação, ou seja, na quantidade de informação que existe em uma determinada amostra heterogênea. Como os outros índices de diversidade, este leva em consideração não só o número de espécies, mas também o número de indivíduos de cada espécie. Porém, como este índice fornece números para a igualdade (equitatividade, equitabilidade, equidade) entre as espécies, ele tornou-se particularmente popular entre os cientistas.

O índice de diversidade de Shannon, compreende tanto a riqueza de substratos quanto a intensidade com que esses substratos são utilizados pela microbiota (Zak *et al.*, 1994; Goodfriend, 1998; Dauber e Wolters, 2000; Lupwayi *et al.*, 2001)

O índice de Shannon é calculado por meio da fórmula :

$$H' = -\sum_{i=1}^S pi \log_2 pi = (\text{Diversidade}).$$

Onde H' = conteúdo de informações da amostra (indivíduo) = índice de diversidade de espécies

A diversidade tende a ser mais alta quanto maior o valor do índice.

Pode-se calcular também a diversidade máxima da amostra, ou seja, a diversidade, se a abundância de todas as espécies encontradas fosse a mesma.

$$H'_{\max} = \text{Log}_2 S = (\text{Diversidade máxima da amostra}).$$

Tendo estes valores, pode-se calcular agora o quanto são proporcionais as abundâncias das espécies amostradas (equitatividade), dividindo-se o índice encontrado pelo índice máximo.

5.5.3 Índice de Pielou

Este é um índice de equitatividade ou uniformidade. A uniformidade se refere ao padrão de distribuição dos indivíduos entre as espécies. Essa medida de uniformidade é definida como:

$$E = \frac{H'}{H_{\max}}$$

em que:

E = índice de uniformidade de Pielou;

H_{\max} = $\ln S$ = diversidade máxima;

S = número de espécies amostradas = riqueza.

O índice de uniformidade oscila de 0 a 1, pertence ao intervalo [0,1], onde 1 representa a máxima diversidade, ou seja, todas as espécies são igualmente abundantes.

5.5.4 Índice de Margalef (DMg) e Menhinick (DMn)

Estes índices avaliam a riqueza das espécies.

$$DMg = \frac{(S-1)}{\ln N}, \text{ e } DMn = \frac{(S)}{\sqrt{N}}$$

onde S representa o número de espécies e N o número total de indivíduos na amostra.

5.5.5 Coeficiente de Mistura de Jentsch (QM)

$$QM = \left(\frac{S}{N} \right)$$

em que:

S = número de espécies amostradas;

N = número total de indivíduos amostrados.

Quanto mais próximo de 1 o valor de QM, mais diversa é a população.

Existem outros índices de diversidade na literatura (por exemplo, índice de Brillouin, também baseado na teoria da informação), mas a filosofia destes índices é sempre a mesma: dar uma idéia não só do número de espécies, mas também da abundância relativa destas espécies.

Os índices têm sido utilizados por serem relativamente simples e permitirem comparações de amostras com diferentes tamanhos de populações (Odum, 1988). O cálculo de índices de diversidade permite identificar desvios em relação à modelos de equilíbrio ecológico, baseados no estudo de comunidades em clímax. A principal vantagem da utilização de índices de diversidade é a tradução de dados ecológicos complexos em números simples, que podem ser entendidos pelo público leigo. A sua aplicação é também justificada pelo fato de que a simples contagem das espécies pode incluir espécies raras e levar a conclusões errôneas. Entretanto, os dados dos índices podem ser interpretados de formas diferentes ou confundidos, dependendo do cálculo usado.

É importante lembrar que o índice é um simples valor. É possível encontrar duas comunidades que possuam índice de diversidade semelhante, entretanto uma pode ter valor de uniformidade alto e baixo valor de riqueza, enquanto a outra pode ter uniformidade baixa e riqueza alta. Ambas, uniformidade e riqueza, precisam ser consideradas na avaliação da diversidade (Kennedy, 1999). O uso de índices que combinam riqueza de espécie e abundância relativa é o mais usado.

5.6. Indicadores microbiológicos de qualidade do solo

Indicadores biológicos são definidos por aqueles organismos (ou populações) dos quais sua ocorrência, vitalidade e mudança dependem das condições do meio ambiente. As várias espécies respondem em uma escala de variáveis que podem ser de diferentes graus de sensibilidade. Espécies resistentes são as menos sensíveis e podem ser consideradas como indicadores cumulativos. É de requerimento que indicadores biológicos possam ocorrer em número suficiente, possuindo reações específicas estimuladas pelo meio ambiente (Kovács, 1992).

Rapport (1983) identificou, para o ecossistema dos Grandes Lagos, nos Estados Unidos, cinco indicadores de perturbação ambiental que podem também ser aplicados aos ecossistemas edáficos. Esses indicadores também foram reconhecidos por Andren e Lagerlof (1983) em estudos dos efeitos de várias práticas culturais na mesofauna do solo. São eles:

- a) Desequilíbrio na concentração de nutrientes (perda de alguns e acúmulo de outros);
- b) Redução na diversidade de espécies;
- c) Substituição de espécies de vida longa por espécies de vida curta (adaptação para um novo ambiente transitório);
- d) Declínio na biomassa da macrofauna e;
- e) Aumento na amplitude de flutuação populacional das espécies chaves.

Um dos problemas com esses indicadores é que eles dão uma indicação *post-factum* das perturbações.

Segundo Halloway e Stork (1991), um bom indicador ecológico deve ser capaz de detectar as perturbações, refletir o funcionamento do ecossistema, apresentar facilidade de monitoramento com viabilidade econômica, ter distribuição universal e ainda mostrar especificidade individual aos padrões de tempo e espaço no ambiente. Por isso, a microbiota do solo tem sido considerada um dos mais sensíveis e úteis marcadores biológicos para classificar sistemas sob distúrbios antrópicos (Turco e Blume, 1998; Kennedy, 1999; Rogers e Tate III, 2001).

Os microrganismos representam a forma de vida mais abundante e diversificada do planeta (Whitman *et al.*, 1998). Eles são capazes de explorar um amplo espectro de fontes de energia e de viver em praticamente todos os habitats. Eles representam o repertório mais rico em diversidade química e molecular na natureza. Além disso, constituem a base de processos ambientais, tais como ciclos biogeoquímicos e cadeias alimentares, e mantêm relações vitais e refinadas entre si e com os organismos superiores (Staley, 1997).

Pouco se conhece sobre o efeito do estresse ambiental sobre os microrganismos do solo, que pode ser bem diferente, tanto espacial quanto temporalmente, ao efeito produzido sobre plantas e animais (Kennedy e Smith, 1995). Essas diferenças devem ser bem definidas para que se possa

formular hipóteses e fazer interpretações corretas sobre os fatores que determinam a diversidade dos microrganismos do solo (Staley, 1997; Coutinho *et al.*, 1999; Rosado, 2000). Além disso, a composição da comunidade de plantas pode influenciar na diversidade da comunidade microbiana devido à variabilidade na composição química dos exudatos liberados (Christensen, 1989).

O estudo da diversidade microbiana e a atividade microbiológica dos solos pode ajudar na identificação de alterações ambientais associadas a distúrbios antrópicos, além de ser importante para o entendimento do papel das comunidades microbianas nos diferentes processos que ocorrem nos ecossistemas (Hugenholtz e Pace, 1996; Rosado *et al.*, 1997).

O diagnóstico completo da diversidade microbiana dos solos é impraticável, em virtude da enorme variedade de espécies, das dificuldades metodológicas e do alto custo que esse levantamento acarretaria. Em razão disso, torna-se necessário identificar espécies, grupos de organismos e, ou estrutura populacional que se correlacionam com outras características que conferem melhorias da estrutura do solo, aumento do teor de matéria orgânica e disponibilidade de nutrientes no solo. Elementos com estas características poderiam ser considerados bioindicadores da qualidade do solo (Vaughan, 1998).

No Brasil, dados sobre atividades microbiológicas de grupos específicos e diversidade genética de microrganismos em áreas de florestas convertidas em pastagens e, ou áreas reflorestadas por leguminosa são inexistentes, mas poderiam ser úteis para avaliar o impacto causado pela ação antrópica nestes ecossistemas. Tanto análises de atividade, quanto de estrutura das comunidades microbianas podem contribuir significativamente para a geração de índices de qualidade biológica do solo.

6. TRABALHOS

6.1. ATRIBUTOS QUÍMICOS E ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA EM SOLOS SOB DIFERENTES COBERTURAS VEGETAIS

RESUMO

O plantio de leguminosas arbóreas como estratégia de recuperação de terras degradadas tem aumentado. Porém o impacto desta prática sobre a atividade microbiana e, ou a fertilidade do solo ainda não é bem conhecido. Este trabalho foi desenvolvido na Fazenda Carrapeta, Conceição de Macabú-RJ, com o objetivo de estudar a influência da *Acacia auriculiformis* (acácia), *Mimosa caesalpinifolia* (sabiá), comparadas as coberturas da capoeira e pastagem sobre a atividade microbiológica e atributos químicos do solo. Para tanto, coletaram-se quatro amostras, compostas de quinze subamostras de solo na profundidade de 0-10cm, e quatro amostras simples de serapilheira, em cada área, em setembro de 2005. Foram avaliados o potencial de mineralização do carbono, nitrificação, desnitrificação e fixação do nitrogênio das comunidades microbianas do solo, além dos atributos químicos do solo e da serapilheira. Avaliou-se, também, a influência da qualidade nutricional do material vegetal sobre a atividade microbiana. O potencial de mineralização do

carbono do solo não diferiu entre as diferentes coberturas avaliadas. A qualidade orgânica e nutricional da serapilheira influenciou a atividade microbiológica do solo. As atividades nitrificadoras e desnitrificadoras foram maiores no solo sob capoeira, sendo significativamente influenciadas pelas concentrações de carbono orgânico, enquanto a atividade fixadora de nitrogênio foi maior nos solos sob acácia e sabiá. A acácia e o sabiá promoveram um aumento significativo da fertilidade do solo, sugerindo o plantio de leguminosas arbóreas, fixadoras de nitrogênio, como estratégia para reabilitação de áreas florestais com impacto antrópico.

Palavras chave: atividade microbiana, leguminosas arbóreas, fertilidade do solo, nitrificadores, desnitrificadores, fixadores de N₂.

CHEMICAL ATTRIBUTES AND MICROBIAL ACTIVITY IN SOILS UNDER DIFFERENT PLANT COVER

ABSTRACT

Plantation of legume trees as strategy to restore degraded forest sites has been increased. However, information on the effects of this practice on the microbial activity and, or the soil fertility is lacking. This research was developed in Carrapeta farm, Conceição de Macabú-RJ, to evaluate the legume trees (*Acacia auriculiformis* (acacia) and *Mimosa caesalpinifolia* (sabiá) effects on the chemical attributes and microbial activity, in comparison to regenerating secondary forest (capoeira) and pasture. The soil (four replicate samples composed of fifteen sub-samples each, from a depth of 0-10 cm) and litter (four samples) were collected in September 2005. Potential carbon mineralization, nitrification, denitrification, N₂ fixation and chemical characteristics were evaluated. The influence of the organic and nutritional quality of the litter on the microbial activity also was evaluated. No significant differences in potential soil C mineralization (SIR) were found between areas. The nutritional and organic litter quality influenced the microbial activity. Potential nitrification and

denitrification were significantly higher at capoeira than the other areas, being significantly influenced by the organic carbon concentration, while N_2 fixation values were the highest in the acácia and sabiá areas. This study indicated significant improvement of soil fertility in the soils under acácia and sabiá, suggesting that plantation of nitrogen-fixing legume trees is one method by which degraded forest sites can be restored.

Keywords: microbial activity, legume trees, soil fertility, nitrifiers, denitrifiers, N_2 fixing communities.

6.1.1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o plantio de espécies leguminosas como estratégia de recuperação de terras degradadas tem aumentado. Isto porque as leguminosas adicionam N ao sistema, facilitam a ciclagem de nutrientes, aumentam a fertilidade na camada superficial do solo, reduzem a erosão devido a uma permanente cobertura do solo pela serapilheira acumulada e mantém a umidade do solo (Wormald, 1992; Franco *et al.*, 1995; Franco e Faria, 1997).

A substituição de áreas de pastagens por plantio de leguminosas sempre acarreta aumento nos estoques de matéria orgânica, proporcionando melhorias na composição química, física e biológica de solo, principalmente em se tratando de solos de baixa fertilidade (Testa *et al.*, 1992; Burle *et al.*, 1997; Silva e Mielniczuk, 1997; Vargas e Scholles, 2000).

Nos ecossistemas florestais, a fertilidade dos solos é proveniente, principalmente, da dinâmica de matéria orgânica do solo e ciclagem de nutrientes, os quais são catalizados pela biota do solo (Alcântara, 1995). Assim, o declínio da atividade microbiana tem grande impacto na fertilidade natural do solo, com grandes efeitos nos ecossistemas naturais (Brookes, 1995). As populações de microrganismos e seus processos podem fornecer evidências de modificações no solo, muitas vezes não detectadas por indicadores físicos ou químicos (Turco *et al.*, 1994). Melloni *et al.* (2001), em estudos envolvendo ecossistemas de campo e mata, no sul de Minas Gerais, verificaram que com a utilização de atributos microbiológicos (número de esporos de bactérias, fungos, microrganismos solubilizadores de fosfatos, celulolíticos e amonificadores totais, C da biomassa microbiana e sua atividade, e quociente metabólico), foi possível caracterizar os diferentes ecossistemas e registrar a presença de uma comunidade microbiana mais ativa nos solos de mata.

A atividade microbiológica é definida como toda reação catalisada pelos microrganismos do solo, refletindo o estado fisiológico de células ativas (Moreira e Siqueira, 2002). Pode ser dividida em atividades gerais e específicas. As atividades gerais são aquelas provenientes de todos os

microrganismos do solo como, por exemplo, a respiração. Já as específicas são mediadas por grupos específicos de microrganismos, como por exemplo, os nitrificadores, desnitrificadores e fixadores de nitrogênio.

A nitrificação refere-se à oxidação de NH_4^+ para nitrato. É um processo muito sensível às alterações do ambiente e tem sido considerado como um bom indicador da atividade biológica e fertilidade do solo (Lopez *et al.*, 1998). Em florestas tropicais, distúrbios como o desmatamento para o estabelecimento de pastagens, geralmente, aumentam as taxas de nitrificação e mineralização de N e os níveis de amônio no solo (Matson *et al.*, 1987; Steudler *et al.*, 1991). Porém, com o aumento da idade das pastagens, observa-se um declínio nas concentrações de N inorgânico e nas taxas de nitrificação e mineralização (Piccolo *et al.*, 1994; Ross *et al.*, 1995; Veldkamp *et al.*, 1999). Anderson e Spencer (1991) sugerem que a nitrificação aumenta após o corte da floresta, mas pode decrescer a níveis basais em 6 meses, se o crescimento da vegetação secundária não for impedido. Stewart *et al.* (1993) indicam que o aumento da taxa de nitrificação pode durar até 5 anos após o episódio de fogo, para então declinar, com uma crescente disponibilidade de NH_4^+ .

A desnitrificação é a transformação do nitrato (NO_3^-) ou do nitrito (NO_2^-) em produtos gasosos (NO , N_2O e N_2). Estima-se que 70% das emissões de N_2O , sejam provenientes de atividade antrópica (Kroeze, 1993). Nas regiões tropicais, os ecossistemas terrestres naturais são considerados responsáveis pela alta emissão de N_2O (Baird, 2002).

A fixação biológica de nitrogênio é um importante componente do ciclo deste elemento, pois reabastece a biosfera de nitrogênio e compensa a sua perda devido à desnitrificação (Postgate, 1987). As leguminosas arbóreas, quando inoculadas e micorrizadas, podem adicionar ao sistema até $600 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ de nitrogênio (Siqueira e Franco, 1988).

A avaliação da atividade microbiológica é uma ferramenta valiosa quando se tem como meta avaliar a dinâmica de carbono e nitrogênio em amostras de solo (Coûteaux *et al.*, 1995; Thirukkumaran e Parkinson, 2000), ou prever os efeitos decorrentes da influência do enriquecimento do dióxido de carbono atmosférico sobre a dinâmica de nutrientes (Ball *et al.*, 2000; Hamilton *et al.*, 2001). Segundo Grisi (1995), ao se medir a atividade dos microrganismos, pode-se ter uma idéia sobre a importância do seu papel nos

ecossistemas, ou seja, se em determinadas condições ambientais as populações microbianas estão em atividade, decompondo a matéria orgânica, promovendo assim a biogeociclagem dos nutrientes. Ainda pela avaliação da atividade microbiana, inclusive em áreas-referência como capoeira (área sem interferências antrópicas recentes) e pastagens (área com impacto antrópico), podem ser identificadas as principais limitações do ecossistema impactado e, sugeridas estratégias visando manter a sustentabilidade do ecossistema.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência da *Acacia auriculiformis* (acácia), *Mimosa caesalpinifolia* (sabiá), comparadas às coberturas da capoeira e pastagem sobre a atividade microbiológica e os atributos químicos do solo.

6.1.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.1.2.1. Caracterização das áreas de estudo

O trabalho foi realizado em áreas pertencentes à Fazenda Carrapeta, no município de Conceição de Macabú-RJ. Segundo a classificação de Köppen, o clima da região é do tipo Am, quente e úmido. A precipitação pluviométrica média anual é de 1400 mm, com presença de duas estações bem definidas: uma seca, de junho a setembro e, outra chuvosa, de outubro a março, quando se concentra quase a totalidade das ocorrências de chuvas. A temperatura média anual situa-se em torno de 26° C. O solo é classificado como Latossolo Vermelho-Amarelo, de textura argilo-franco-arenoso.

A área experimental constitui-se de quatro coberturas vegetais em parcelas de 1500 m² (75 x 20). As parcelas experimentais de cada cobertura foram dispostas adjacentes uma da outra, na mesma cota de altitude. As coberturas vegetais foram constituídas de plantios puros das espécies arbóreas *Acacia auriculiformis* (acácia), *Mimosa caesalpinifolia* (sabiá), inoculadas com estirpes selecionadas de bactérias fixadoras de N₂ e fungos micorrízicos. As outras duas coberturas vegetais, utilizadas como referência, ambas com aproximadamente 40 anos de idade, foram uma pastagem degradada que representa a vegetação anterior ao plantio das espécies arbóreas com predomínio de *Melinis minutiflora* (capim-gordura), capim-colômbio, *Paspalum maritimum* (grama-pernambuco) e *Imperata brasiliensis* (sapê) e um fragmento florestal da Mata Atlântica em sucessão secundária, com espécies em diferentes estádios sucessionais. A escolha da capoeira como um dos ecossistemas de referência trata-se de uma das estratégias utilizadas para avaliar alterações do solo em decorrência do tipo de uso e de técnicas de manejo, por meio da comparação das características do solo manejado com as do solo não manejado, sob vegetação natural (Barros e Comerford, 2002).

6.1.2.2. Amostragens

Em cada cobertura vegetal, quatro amostras compostas de solo foram coletadas, sendo cada uma constituída de quinze amostras simples coletadas ao acaso nas entrelinhas de plantio, na profundidade de 0-10cm, em setembro de 2005. Para a coleta da serapilheira, considerada aqui como todo o resíduo

vegetal (folhas, galhos, cascas, etc) depositado sobre a superfície do solo, em diferentes graus de decomposição, utilizou-se um gabarito quadrado de madeira de $0,25\text{m}^2$, com quatro repetições. As amostras de solo e serapilheira foram acondicionadas em sacos plásticos e levadas ao Laboratório de "Ecologie Microbienne" da Universidade "Lyon 1- France", para as análises de atividades microbiológicas e diversidade bacteriana. As demais análises foram feitas no Laboratório de Solos da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

As amostras de solo foram destorradas e passadas em peneira de 2mm de malha, homogeneizadas, retirando-se as raízes e resíduos visíveis de plantas e animais do solo. As amostras de solo foram divididas em três partes: a primeira destinada às análises microbiológicas (armazenada em câmara fria a 4°C até a época das análises, 7 dias), a segunda, para a caracterização da diversidade microbiana (preservada a -20°C até a data de extração de DNAs, 7 dias) e a terceira, seca ao ar, para análise química e granulométrica.

As amostras de serapilheira foram divididas em duas partes. As destinadas para a caracterização da diversidade microbiana foram trituradas e armazenadas, conforme descrito para as amostras de solo. A outra parte foi seca em estufa com circulação de ar forçada à temperatura de 60°C e moída para análise química e nutricional.

6.1.2.3. Análises laboratoriais

6.1.2.3.1. Solos: Atributos químicos e físico

Os solos foram analisados para a determinação do pH (em água); teores de P, K (extraíveis, por Mehlich – 1), Ca, Mg e Al (trocáveis, por KCl 1 mol L^{-1}) (Defelipo e Ribeiro, 1981). O carbono orgânico (C-org.) do solo foi determinado por oxidação com dicromato de potássio, $1,25\text{ mol}_c\text{ L}^{-1}$ em meio ácido (Anderson e Ingram, 1996) e o nitrogênio total (Ntotal) pelo método de Kjeldahl, conforme descrito em Embrapa (1997). A análise granulométrica foi determinada segundo Embrapa (1997).

6.1.2.3.2. Serapilheira: Atributos químicos

Determinou-se, na serapilheira, os teores de K (fotometria de chama), de P (espectrofotometria e, pelo método da vitamina C, modificado por Braga e Defelipo, 1974), de Ca e Mg (espectrofotometria de absorção atômica), após

digestão nítrico-perclórica (Tedesco et al., 1995), e de N pelo método Kjeldahl, descrito por Bataglia et al. (1983). O teor de C foi obtido por oxidação com dicromato de potássio (Anderson e Ingram, 1996). As concentrações de lignina e celulose presentes foram quantificadas pelo método fibra em detergente ácido (FDA), descrito por Van Soest e Wine (1968), e as concentrações de polifenóis totais extraídas através do método de Anderson e Ingram (1996).

6.1.2.3.3. Respiração induzida pelo substrato (SIR)

A respiração induzida pelo substrato (SIR) foi determinada por cromatografia gasosa utilizando coluna de Porapak Q 100-120 mesh, N₂, forno 60°C, injetor 120°C e detetor 375°C. Em amostras de 10g de solo foram adicionados 1ml de glucose e água para elevar a umidade a 70% da capacidade de campo. As leituras foram realizadas após incubação a 26°C por 2, 3, 4, 5 e 6 horas. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g C h}^{-1} \text{g}^{-1}$ de solo seco (Anderson e Domsch, 1978).

6.1.2.3.4. Potencial de desnitrificação

O estudo da cinética do processo de desnitrificação foi realizado em laboratório através do método de Smith e Tiedje (1979), Tiedje *et al.* (1989). Utilizou-se 10 g de solo (peso seco), em frasco de 150 mL previamente vedados com tampa de borracha e lacrados com anel de alumínio, com 4 repetições por tratamento. Por 6 ciclos consecutivos de 5 minutos cada, procedeu-se a uma série de vácuo alternado de injeção de gás hélio, para ter o sistema livre de O₂. Posteriormente injetou-se 10% de acetileno na atmosfera do erlenmeyer, sabendo que o acetileno inibe a redução enzimática do N₂O para N₂ (Yoshinari *et al.*, 1977) e que, geralmente, 1 a 10% do volume é necessário para que isto ocorra. Assim, a desnitrificação pode ser medida pela quantidade de N₂O, produto final da atividade da comunidade desnitrificadora. Acrescentou-se uma solução nutritiva de KNO₃ (200 $\mu\text{g N-NO}_3^- \text{g}^{-1}$ solo seco), glicose (1mg C-glic g^{-1} equivalente solo seco) e ácido glutâmico (1mg C-glu g^{-1} equivalente solo seco) para elevar a umidade a 100% da capacidade de campo. Os frascos foram incubados a 26°C, no escuro, e amostras da sua atmosfera foram tomadas nos tempos, 2, 3, 4, 5 e 6 horas. As análises foram realizadas em cromatografia gasosa utilizando coluna de Porapak Q 100-120 mesh, N₂, forno 60°C, injetor 120°C e detetor 375°C. O potencial de desnitrificação foi expresso em $\mu\text{g N-N}_2\text{O h}^{-1} \text{g}^{-1}$ solo seco.

6.1.2.3.5. Potencial de nitrificação

O termo potencial de nitrificação tem sido aplicado para medidas de taxas de nitrificação obtidas em condições de laboratório, sabendo que o processamento das amostras para incubação, incluindo peneiramento, secagem, armazenagem, etc., perturbam as amostras. Essas perturbações, combinadas com as condições de incubação (temperatura, umidade, etc.) são diferentes daquelas encontradas no campo, assim sendo, resultando em taxas de nitrificação também diferentes (Hart *et al.*, 1994). Nesse sentido, o termo potencial de nitrificação não, necessariamente, quantifica a taxa máxima de nitrificação encontrada no campo, mas sim, aquela definida pelas condições de incubação. Sabendo disso, procedeu-se a análise do potencial nitrificador da comunidade microbiana através da quantificação de N_2O liberado no processo de denitrificação do nitrato formado durante a oxidação do amônio, segundo o método de Lensi *et al.* (1986).

Trabalhou-se com dois frascos de 150mL por amostra, utilizando-se 10 g de solo (equivalente peso seco), com 4 repetições por tratamento, para determinar a quantidade de NO_3^- presente no solo (T_0) e o potencial de acumulação de NO_3^- em 24 horas (T_{24h}). Procedeu-se à retirada do O_2 na atmosfera do frasco T_0 e o bloqueio da redução enzimática de N_2O para N_2 conforme foi descrito acima. No frasco T_{24h} , foi adicionada uma solução nutritiva de $(NH_4)_2SO_4$ ($200\mu g N-NH_4^+ g^{-1}$ solo seco) para elevar a umidade a 70 % da capacidade de campo. O mesmo foi vedado com papel *parafilm* e incubado juntamente com o frasco T_0 a $26^\circ C$, no escuro. Após o período de 24 horas de incubação, fez-se a transformação de nitrato através do processo de desnitrificação. Adicionou-se uma suspensão de bactérias desnitrificadoras (*Pseudomonas fluorescens* AK15, $DO_{580nm} = 2$) e uma solução nutritiva glicose ($1mg C-glc g^{-1}$ solo seco) e ácido glutâmico ($1mg C-glu / g$ solo seco), para elevar a umidade a 100 % da capacidade de campo. O potencial de nitrificação ($\mu g N-NO_3^- h^{-1} g^{-1}$ solo seco) é obtido pela diferença entre a quantidade de NO_3^- presente após incubação em aerobiose (T_{24h}) e a quantidade de NO_3^- inicialmente presente no solo (T_0).

6.1.2.3.6. Potencial de fixação do nitrogênio

A atividade da enzima nitrogenase responsável pela fixação biológica do nitrogênio foi avaliada segundo o método de Hardy *et al.* (1968), Turner e

Gibson (1980). As vantagens e desvantagens dessa técnica foram discutidas por Vessey (1994) e Minchin *et al.* (1994).

O princípio deste método é a quantificação do etileno formado durante a incubação de 10 g de solo (peso seco), com 4 repetições por tratamento, 15 ml de acetileno, glicose (1mg C-glic g⁻¹ solo seco) e malato (1mg C-mal g⁻¹ solo seco) dentro de um frasco de 150 ml, hermeticamente fechado, durante cinco dias a 26°C e capacidade de campo. O etileno produzido foi avaliado diariamente por cromatografia gasosa. O potencial de fixação de N foi expresso em µg N h⁻¹ g⁻¹ solo seco.

6.1.2.4. Análises estatísticas

A análise de variância dos atributos químicos e microbiológicos das amostras do solo e da serapilheira foi realizada adotando-se o delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições. Cada cobertura vegetal foi considerada um tratamento de efeito fixo a exemplo do procedimento empregado por Lugo *et al.* (1990) e Gama-Rodrigues *et al.* (2005). A comparação das médias foi feita pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade. Foram estabelecidas análises de regressões entre os atributos avaliados.

6.1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O nível de fertilidade do solo sob as coberturas vegetais, de maneira geral, foi baixo a médio, acidez elevada, e bom nível de matéria orgânica, com base na classificação proposta por Tomé Junior (1997) e Alvarez *et al.* (1999). Houve diferença significativa entre as coberturas vegetais para o nível de fertilidade do solo (Quadro1). A acácia e o sabiá foram as coberturas vegetais que apresentaram maiores valores de cálcio (Ca), soma de base (SB) e nitrogênio total (Ntotal), sendo que para este último a capoeira não diferiu das leguminosas. Os valores de magnésio (Mg) também foram maiores na acácia e no sabiá, a capoeira apresentou valor intermediário que não diferiu do sabiá e da pastagem. O solo da capoeira apresentou pH inferior ao das leguminosas, mostrando correspondentemente maior teor de alumínio trocável (Al) e acidez potencial (H+Al) (Quadro 1). Resultados similares foram observados por Vezzani *et al.* (2001) em plantios de *Eucalyptus saligue* e *Acacia mearnsii* com 45 meses de idade.

As regressões lineares positivas de Ca, SB e negativas de Al e H+Al com pH (Quadro 2), confirmam o aumento da fertilidade do solo com base na elevação do pH. Altos valores de pH do solo são comumente associados com níveis mais elevados de fertilidade, sobretudo a disponibilidade de bases trocáveis, em grande parte devido a capacidade desses solos de neutralizar os produtos ácidos da decomposição, ou seja, os cátions metálicos, como Ca^{2+} , presentes na solução do solo podem se orientar e estabelecer interações de ordem eletrostáticas com os grupamentos funcionais da matéria orgânica. De acordo com Pompéia (1994), a acidificação do solo tem efeito direto na lixiviação de macronutrientes (Ca^{2+} , Mg^{2+}), o que poderá ocasionar a perda da fertilidade do solo (no caso dos macronutrientes). O pH ácido afeta ainda, de maneira indireta e negativa, a microbiota do solo, pois, em solos com baixos valores de pH, elementos como Fe, Al e Mn atingem níveis tóxicos.

Quadro 1: Análise química das amostras de solo coletadas nas diferentes coberturas estudadas

Coberturas	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	CTC	pH	P	K	Na	C-org	Ntotal	C:N
	-----cmol _c dm ⁻³ -----						-----mg dm ⁻³ -----			-----g kg ⁻¹ -----			
Acácia	1,2 a	0,6 a	0,3 c	4,8 d	1,9 a	6,7 c	4,6 a	4,8 a	36,3 b	31,0 c	30,5 b	2,9 a	11,1 a
Sabiá	1,5 a	0,5 ab	0,4 c	6,2 c	2,1 a	8,3 b	4,6 a	4,3 a	51,5 a	39,8 a	30,5 b	2,9 a	10,7 a
Capoeira	0,3 b	0,4 bc	1,8 a	9,6 a	0,8 b	10,4 a	4,0 b	4,8 a	28,0 b	32,0 bc	38,7 a	2,8 a	13,8 a
Pastagem	0,6 b	0,3 c	1,2 b	7,3 b	1,0 b	8,3 b	4,3 ab	3,0 a	40,8 ab	37,0 ab	30,4 b	1,9 b	16,1 a
CV%	59,5	29,6	69,5	26,4	43,3	17,0	7,6	26,4	29,5	13,6	14,8	22,2	26,5

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra em cada coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan em nível de 5% de probabilidade.

CV: coeficiente de variação; Ca: cálcio; Mg: magnésio; Al: alumínio trocável; H+Al: acidez potencial; SB: soma de base; CTC: capacidade de troca catiônica; P: fósforo; K: potássio; Na: sódio; C-org: carbono orgânico; Ntotal: nitrogênio total; C:N: relação entre carbono orgânico e nitrogênio total.

Quadro 2: Regressões entre as atividades microbiológicas e as características químicas do solo e da serapilheira em quatro áreas sob diferentes coberturas vegetais. n =16

Regressões	R ²
CTC solo = 0,226 C-org solo + 1,048	0,55**
Ca solo = 1,233 pH solo - 4,470	0,56**
SB solo = 1,398 pH solo - 4,658	0,53**
Al solo = - 1,474 pH solo + 7,342	0,56**
H+Al solo = - 4,030 pH solo + 24,525	0,50**
SIR = - 2,596 Mg + 4,682	0,26*
SIR = - 0,534 SB + 4,328	0,26*
SIR = + 0,531 Al + 3,075	0,27**
SIR = 0,100 C:N solo + 2,267	0,28**
SIR = 0,159 H+Al solo + 2,454	0,19*
DENIT = 3,207 NIT + 0,256	0,81**
NIT = 7,269 C-org solo - 0,372	0,50**
DENIT = 2,173 C-org solo - 0,998	0,43**
NIT = 1,359 SIR - 0,187	0,18*
DENIT = 0,307 SIR - 0,596	0,28**
FIX = + 165,325 pH - 640,012	0,47**
FIX = - 31,772 (H+Al) solo + 301,675	0,55**
FIX = - 910,096 Al solo + 174,989	0,71**
FIX = - 6,570 C-org + 293,793	0,11*
FIX = 68,458 Ntotal solo - 99,820	0,22*
FIX = 132,779 Ca solo - 39,328	0,84**
FIX = 338,860 Mg solo - 65,893	0,27*
FIX = 117,292 SB solo - 87,687	0,88**
FIX = - 400,061 Nit + 110,343	0,17*
FIX = 68,458 N total solo - 99,820	0,22*
FIX = - 137,348 Denit + 148,617	0,28**
Ca solo = 5,472 Celulose + 0,246	0,22*
Mg solo = 5,699 Celulose + 0,281	0,20*
SB solo = 4,347 Celulose + 0,608	0,27**
N total solo = - 1,742 C:N serapilheira + 4,159	0,15*
NIT = 69,263 C-org serapilheira - 0,317	0,36**
NIT = 5,435 Ntotal serapilheira - 0,156	0,27*
DENIT = 4,738 C-org serapilheira - 1,001	0,43**
DENIT = 1,218 Ntotal serapilheira - 0,532	0,47**
SIR = - 0,892 polifenóis/N + 4,107	0,13*
SIR = - 6,145 celulose/N + 4,049	0,11*
NIT = - 3,275 celulose/N da serapilheira + 0,167	0,20*
NIT = - 20,140 (lignin+celulose/N) serapilheira + 0,208	0,14*
DENIT = - 0,112 celulose/N da serapilheira + 0,834	0,22*
DENIT = - 1,588 (lignina+celulose/N) serapilheira + 0,969	0,14*

CTC: capacidade de troca catiônica; C-org: carbono orgânico; Ca: cálcio; SB: soma de base; Al: alumínio trocável; H+Al: acidez potencial; SIR: respiração induzida pelo substrato ou potencial de mineralização; Mg: magnésio; C:N: relação entre carbono orgânico e nitrogênio total; Denit: desnitrificação; Nit: nitrificação; C-org: carbono orgânico; Ntotal: nitrogênio total; Fix: fixação biológica de nitrogênio; polifenóis/N: relação entre polifenóis totais e nitrogênio total; celulose/N: relação entre celulose e nitrogênio total;

O decréscimo da capacidade de troca catiônica (CTC) do solo sob pastagem foi concomitante à redução no teor de carbono orgânico (C-org), quando comparado com a capoeira (Quadros 1 e 2), o que indica que a baixa disponibilidade de forragem na pastagem, em decorrência do manejo inadequado do pastejo, está contribuindo para a diminuição dos valores de carbono orgânico e CTC. Vários autores observaram que a substituição da vegetação nativa por pastagens provoca diminuição nos teores do carbono do solo. Moraes (1991), estudando uma cronossequência de pastagens em Rondônia, observou uma diminuição de 25% do C original após 20 anos de uso; Veldkamp (1994), estudando áreas com pastagens na Costa Rica, encontrou, na camada de 0-40 cm, uma perda de 20% nos estoques de C após 25 anos de uso. Marchiori Jr e Melo (1999) observaram, em um Nitossolo Vermelho, uma redução do teor de carbono orgânico de 18% com o cultivo de pastagem em relação a uma mata nativa. Souza *et al.* (2005), avaliando o carbono e nitrogênio da biomassa do solo em solos sob pastagem, mata nativa e áreas reflorestadas com *araucária* e *pinus* no Planalto dos Campos Gerais, Santa Catarina, observaram que os teores de carbono orgânico nas áreas de reflorestamento diferiram estatisticamente dos encontrados na mata, sendo 15,7% e 14,5% menores.

O maior valor de carbono na capoeira, refletindo em maior CTC neste solo, pode ser explicado pelo ambiente estável deste sistema, o que implica em um balanço entre as taxas médias de entrada de carbono no solo, via resíduo vegetal e conseqüente decomposição pela microbiota, e as taxas médias de mineralização do material orgânico do solo. No solo sob leguminosas, foi observada grande deposição e acumulação de resíduos orgânicos, a qual não foi suficiente para recompor o teor de carbono orgânico no solo nos níveis da capoeira. Contudo, é possível que, com o passar do tempo, quando houver significativo acúmulo de serapilheira, os níveis de carbono orgânico e CTC nos solos sob plantio de leguminosas venham a alcançar ou a superar os da capoeira.

A respiração induzida pelo substrato (SIR) não apresentou variação significativa, indicando uma atividade similar da comunidade microbiana entre as coberturas estudadas (Figura 2). Os valores de carbono liberado correspondem à maior velocidade de produção de C-CO₂ e foram obtidos no intervalo de tempo compreendido entre 4 e 7 horas de incubação. A SIR (C-

CO₂ liberado) apresentou regressões lineares negativas com Mg, SB e positivas com Al (Quadro 2). Para estes resultados, não se tem uma explicação clara, mas poderia se deduzir um efeito biotóxico do Al (condição de estresse) contribuindo para aumentar as perdas de carbono na forma de CO₂ (Davies *et al.*, 1964) no solo sob capoeira e, também, a eficiência no uso do carbono pela comunidade microbiana (altas taxas de mineralização e baixas perdas de C-CO₂) nos solos onde foram encontrados maiores valores de fertilidade (acácia, sabiá e pastagem). Pinto (2001), avaliando a contribuição de espécies arbóreas de diferentes fases sucessionais da Floresta Estadual do Palmito, Paranaguá-PR, mostrou aumentos de K e N, favorecendo a atividade microbiana.

Encontrou-se regressões lineares positivas entre SIR com a acidez potencial (H+Al) e a relação C:N (Quadro 2), que sugere uma alta eficiência metabólica da comunidade microbiana no processo de mineralização do carbono orgânico do solo, nas áreas avaliadas. Solos com alta relação C:N e acidez potencial (H+Al) apresentam mudanças na composição e atividades metabólicas, considerando o estresse da população (Siqueira e Franco, 1988).

Segundo Leita *et al.* (1995), um maior valor da respiração microbiana deve-se a uma maior reciclagem da população microbiana, necessitando de um maior consumo de energia para a sua sobrevivência. Nos solos com baixa relação C:N e, ou carbono orgânico de alta qualidade, é maior a eficiência metabólica da biomassa microbiana, havendo, assim, menores perdas de C na forma de CO₂. Pelo fato do teor de carbono orgânico ser maior no solo sob capoeira, era esperado ter maior atividade respiratória. Isto não ocorreu, provavelmente, devido ao elevado valor de (H+Al) encontrado neste solo, visto que a forte acidez do solo afeta negativamente a respiração microbiana do solo (Siqueira e Franco, 1988). Em relação aos valores de C-CO₂ encontrados no solo sob plantio de leguminosas, pode-se especular que a melhoria na fertilidade, como, por exemplo, aumento de Ca, Mg, SB, pH e redução de Al e (H+Al) nestes solos, proporcionou um crescimento da população de microrganismos oportunistas que apresentou uma atividade similar a da capoeira.

Os valores de potencial de nitrificação e desnitrificação variaram entre 0,02 e 0,22 µg de N-NO₃⁻ h⁻¹ g⁻¹ solo seco e 0,28 e 1,02 µg de N-N₂O h⁻¹ g⁻¹ solo seco, respectivamente, para as diferentes coberturas vegetais (Figuras 3 e 4). Carmo *et al.* (2005), determinando as alterações na disponibilidade de N e os

fluxos de N_2O no solo de uma pastagem e área de floresta da Amazônia, encontraram valores superiores de $N-NO_3^-$ e $N-N_2O$ variando entre 0,11 e 1,12 μg de $N-NO_3^- h^{-1} g^{-1}$ solo seco e 3,03 e 53,36 μg de $N-N_2O h^{-1} g^{-1}$ solo seco, respectivamente.

Os fluxos de N_2O liberado (desnitrificação) foram maiores no solo sob capoeira e estatisticamente iguais entre as demais coberturas (Figura 3), provavelmente, porque a capoeira também apresentou maior teor de $N-NO_3^-$ (nitrificação) (Figura 4), o que estaria contribuindo para a produção de N_2O . O envelhecimento de um ecossistema tropical leva a um aumento na abundância de N, gerando, conseqüentemente, maiores perdas de N do sistema através de vários mecanismos (Chadwick *et al.* 1999; Hedin *et al.* 2003). Estes resultados são confirmados pela regressão significativa positiva do fluxo de N_2O (desnitrificação) em função da quantidade de nitrato produzido (nitrificação) (Quadro 2). Resultados semelhantes foram encontrados por Patra *et al.* (2005), estudando os efeitos de pastagens sobre grupos funcionais de microrganismos envolvidos no ciclo de N.

Os teores de $N-NO_3^-$ (nitrificação) e $N-N_2O$ (desnitrificação) foram, fortemente, influenciados pelos teores de carbono orgânico e a respiração microbiana do solo (SIR) (Quadro 2). As regressões positivas entre esses atributos mostram que a atividade de desnitrificação depende da concentração de carbono disponível; e, também, da qualidade dos doadores de elétrons (Paul e Clark, 1989). O carbono facilmente decomponível, ao ser adicionado ao solo, é rapidamente assimilado pelos microrganismos, aumentando a demanda de O_2 , o que pode resultar em microssítios de anaerobiose no solo, favorecendo a desnitrificação (Giacomini *et al.*, 2006). Adicionalmente, quanto maior a disponibilidade de carbono nos ecossistemas florestais maior será a atividade dos microrganismos heterotróficos e, conseqüentemente, maior será o incremento nos fluxos de NO_3^- servindo como substrato energético para os microrganismos desnitrificadores e, pela redução da disponibilidade de O_2 no meio. A desnitrificação biológica envolve a redução, por via biológica, do nitrato a nitrito e nitrito a nitrogênio gasoso. O nitrito e o nitrato fornecem oxigênio para respiração microbiana da própria reação de denitrificação. Para que a desnitrificação ocorra, conjugada com a nitrificação, os nitratos devem estar presentes juntamente com uma fonte de carbono (Aulakh *et al.*, 1992; D'Haene *et al.*, 2003) e em condições anóxicas (aeróbia mas com ausência de oxigênio).

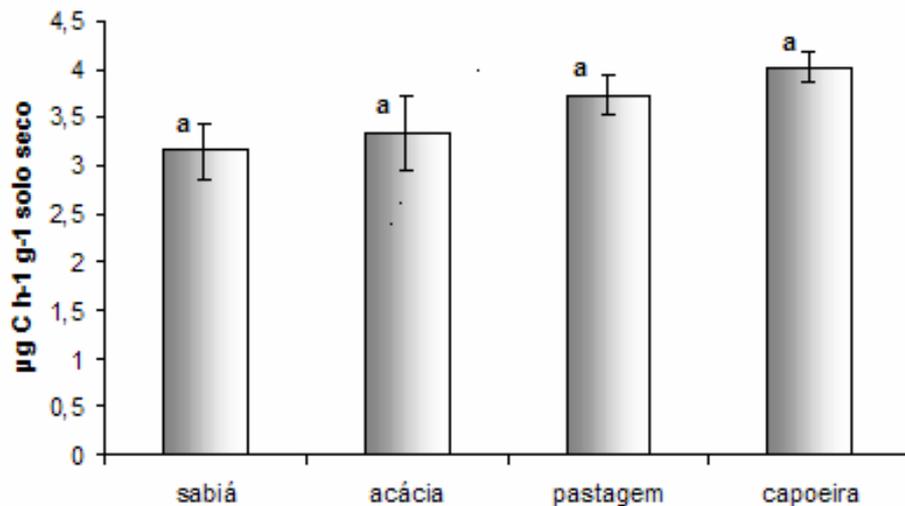


Figura 2: Evolução do CO₂ da população microbiana de solos sob quatro diferentes coberturas vegetais. Média de 4 repetições.

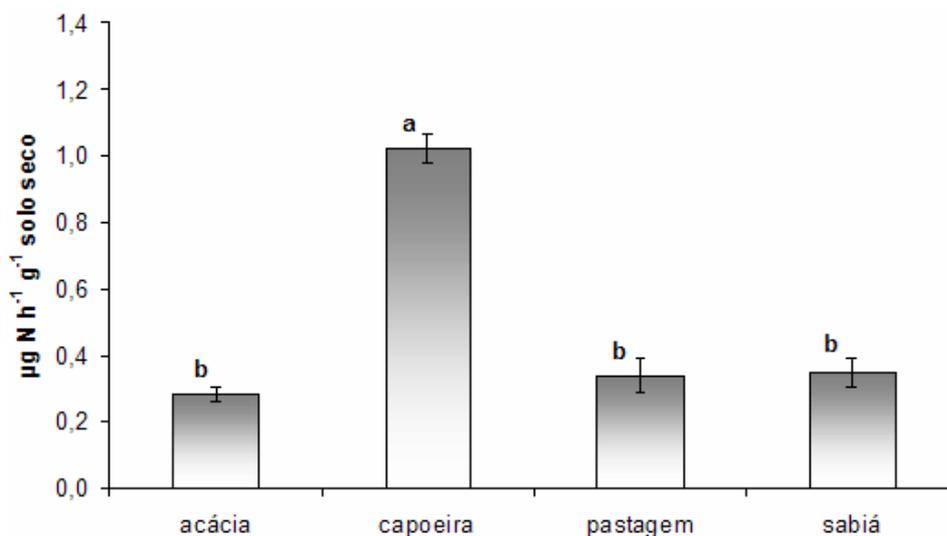


Figura 3: Potencial de desnitrificação da população microbiana de solos sob quatro diferentes coberturas vegetais (Média de 4 repetições).

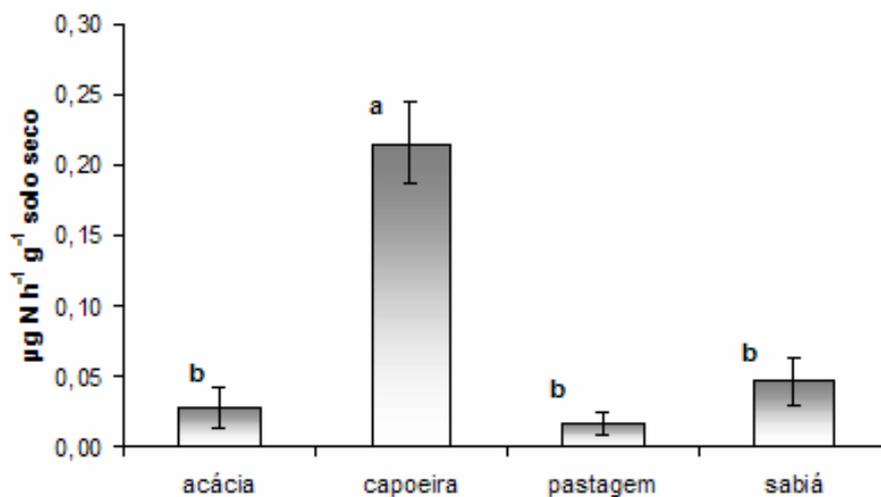


Figura 4: Potencial de nitrificação da população microbiana de solos sob quatro diferentes coberturas vegetais (Média de 4 repetições).

Os teores de $N-N_2O$ foram superiores aos de $N-NO_3^-$ (figuras 3 e 4) em todas as áreas avaliadas, indicando perdas de nitrogênio através do processo de desnitrificação. O conhecimento da cinética dos processos de nitrificação e desnitrificação é muito útil e necessário para avaliar os efeitos da atividade antrópica na atividade biológica do solo. O efeito resultante dos processos de desnitrificação e nitrificação determinará as perdas de N na forma de N_2O , ou a acumulação de nitrato no solo.

Houve diferença significativa na atividade da nitrogenase entre as coberturas estudadas. Os teores de nitrogênio obtidos através da fixação biológica de N_2 da acácia e do sabiá foram superiores aos encontrados na capoeira e na pastagem, as quais apresentaram déficit acima de 88% em relação ao plantio de leguminosas (Figura 5). Isto foi indicativo da grande capacidade dessas leguminosas de fixarem o nitrogênio atmosférico mediante as associações mutualísticas com bactérias do gênero *Rhizobium* (Kannegiesser, 1990), proporcionando a adição deste nutriente no sistema e contribuindo para a sustentabilidade dos agroecossistemas (Alfaia, 1997). Balieiro *et al.* (2004) observaram maior aporte de N em área de plantio de leguminosa arbórea *guachapele* em relação ao plantio de eucalipto, evidenciando o benefício dessa no sistema.

As regressões significativas positivas do pH e negativas da acidez potencial (H+Al), dos teores de Al e do carbono orgânico do solo com a atividade da nitrogenase (fixação de N_2) representam modelos preditivos que explicam a variação do potencial de fixação do nitrogênio nas diferentes coberturas avaliadas (Quadro 2). Altos níveis de carbono, H^+ e Al causam inibição da nitrogenase, afetando negativamente a fixação biológica de nitrogênio.

Segundo Duguma *et al.* (1988), o baixo pH e a toxidez do Al prejudicam o processo de fixação do N_2 . Regressões lineares positivas foram obtidas entre a atividade da nitrogenase (FIX) com os teores de Ntotal, Ca, Mg e SB do solo (Quadro 2). Tais resultados mostram que o plantio das leguminosas fixadoras de N promoveu um aumento significativo da fertilidade do solo. Costa *et al.* (1997), observaram num plantio de sabiá com seis anos de idade, que os principais nutrientes incorporados foram C, P, K, Ca e Mg, com significativo aumento nas concentrações de N.

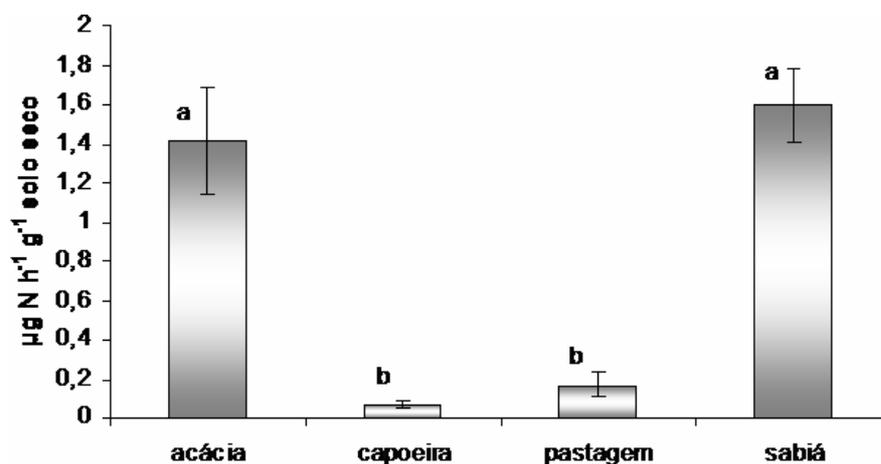


Figura 5: Potencial de fixação de nitrogênio da população microbiana de solos sob quatro diferentes coberturas vegetais (Média de 4 repetições).

A atividade da nitrogenase relacionou-se negativamente com o N-NO_3^- (Nit) e, positivamente, com o nitrogênio total do solo (Quadro 2), indicando que o N, dependendo da forma que ele se encontra no solo, pode afetar o processo de fixação biológica do nitrogênio. O alto teor de nitrato (NO_3^-) na capoeira pode ter contribuído para inibir a fixação biológica do nitrogênio nesse solo. Efeito inibitório do processo de fixação biológica de N_2 , decorrente da adição de nitrato, foi observado em espécies leguminosas, como *Acacia auriculiformis* (Goi *et al.*, 1992) e *Mimosa caesalpinifolia* (Goi *et al.*, 1997).

O efeito maléfico do íon NO_3^- no processo de fixação biológica de nitrogênio pode ser explicado pela relação do nitrato com o processo de difusão do O_2 nos nódulos (Vessey e Waterer, 1992) e a toxicidade do nitrito (Rigaud e Puppo, 1977). Estas hipóteses são comprovadas pelas regressões lineares negativas entre a atividade da nitrogenase (Fix) e os processos de nitrificação e desnitrificação (Quadro 2).

Os teores médios de fósforo (P), potássio (K), sódio (Na) e lignina na serapilheira mostraram-se estatisticamente iguais entre as quatro coberturas vegetais estudadas. A capoeira apresentou maiores teores de carbono orgânico e o N total da serapilheira, diferindo das demais coberturas que foram estatisticamente iguais entre si, exceto a acácia que apresentou menor valor de carbono orgânico (Quadro 3).

As serapilheiras da acácia e do sabiá apresentaram maiores teores de Ca e foram estatisticamente iguais aos da capoeira que, por sua vez, não diferiu da pastagem. Os teores de Mg foram maiores na capoeira e no sabiá que não diferiram entre si. A acácia apresentou o valor médio intermediário e

não diferiu do sabiá e da pastagem estatisticamente iguais entre si e nem da pastagem (Quadro 3). Estes resultados sugerem o papel importante das leguminosas na ciclagem biogeoquímica do Ca e Mg, especialmente em áreas com impacto antrópico. [Barreto e Fernandes \(2001\)](#), avaliando o aporte de biomassa e o efeito da *Gliricídia sepium* sobre as forrageiras herbáceas, em um Latossolo Amarelo em Lagarto/SE, verificaram que esta leguminosa arbórea fixadora de nitrogênio promoveu o aumento do teor de Ca mais Mg. Segundo Oliveira e Lacerda (1993) e Louzada *et al.* (1995), a magnitude do aporte de nutrientes por meio da produção de serapilheira em plantios de leguminosas arbóreas supera a faixa observada para fragmentos da Floresta Atlântica.

Encontrou-se regressões lineares positivas entre Ca, Mg, SB do solo com os teores de celulose (Quadro 2). A relação C:N da serapilheira também permitiu prever a variação do N total do solo (Quadro 2). Estes resultados demonstram que a ciclagem desses nutrientes em ecossistemas como os de florestas (naturais ou plantadas) e de pastagem está intimamente ligada a qualidade da serapilheira. Segundo Constantinides e Fownes (1994), a concentração de carbono, nitrogênio, lignina e a relação C:N exercem influência na decomposição dos resíduos. A pastagem com maior relação C:N, possivelmente, apresentou uma quantidade maior de compostos de carbono menos lábeis, o que resultaria em taxas mais baixas de mineralização e disponibilização de nutrientes no solo.

Os teores de N total e de carbono orgânico da serapilheira permitiram prever a variação do potencial de nitrificação e desnitrificação nos solos sob as diferentes coberturas avaliadas (Quadro 2). Altas concentrações de carbono e nitrogênio nos resíduos orgânicos determinam taxas mais elevadas de decomposição, promovendo taxas de mineralização de N mais acentuadas, o que eleva a disponibilidade de amônio no solo. Nessas condições, a atividade dos microrganismos nitrificantes é maior (Vitousek *et al.*, 1982), o que resulta num aumento na produção de nitratos, elevando, por conseguinte, a atividade dos microrganismos desnitrificantes (Stouthamer *et al.*, 1980; Tiedje, 1988; Patra *et al.*, 2005).

A acácia e o sabiá não diferiram entre si e apresentaram as maiores concentrações de celulose. A pastagem, com a menor concentração, não diferiu da capoeira e do sabiá. Com relação as concentrações de polifenóis

totais, maiores valores foram observados no sabiá e na capoeira estatisticamente iguais entre si e, as menores concentrações, na acácia e na pastagem, que não diferiram da capoeira (Quadro 3). Segundo Vanlauwe *et al.* (1997), ainda não existe um consenso em relação ao melhor indicador de decomposição. Entretanto, os compostos fenólicos são, frequentemente, correlacionados negativamente com a velocidade de decomposição (Monteiro, 2001; Ndaw, 2003; Froufe, 2003), considerando que este grupo de substâncias tende a se complexar com as formas de N, tornando este elemento menos disponível para a comunidade decompositora (Tian *et al.*, 1992; Constantinides e Fownes, 1994).

De modo geral, as coberturas vegetais produziram serapilheira de boa qualidade nutricional, determinada pelos baixos teores de polifenóis totais e valores das relações C:N, N:P, polifenol:N, polifenol:P e celulose:N (Quadro 3). As regressões lineares negativas entre o potencial de mineralização (SIR) com as relações polifenol:N e celulose:N (Quadro 2) mostram que a serapilheira de baixo nível de recalcitrância propicia aumentos na atividade microbiana do solo, corroborando a semelhança entre as áreas em termos de teores de CO₂ liberado.

As regressões lineares negativas entre os teores de N-NO₃⁻ (nitrificação) e N-N₂O (desnitrificação) com as relações celulose:N e lignina+celulose:N, (Quadro 2) mostram os efeitos negativos da baixa qualidade da serapilheira nos processos de nitrificação e desnitrificação. Altas relações lignina+celulose:N e baixas concentrações de celulose são associadas com baixas taxas de decomposição (Aber e Melilo, 1980; Froufe, 2003) e liberação de N (Ndaw, 2003; Monteiro e Gama-Rodrigues, 2004). Nessas condições, ocorre uma competição por amônio entre os microrganismos heterotróficos do solo, o que resulta em baixas taxas de nitrificação e desnitrificação.

Quadro 3: Análise da qualidade química e nutricional das amostras de serapilheira coletadas nas diferentes coberturas estudadas

Coberturas	Ca	Mg	P	K	Na	C-org	N total	Polifenóis	Lignina	Celulose
-----g kg ⁻¹ -----										
Acácia	11,3 a	0,9 bc	0,3 a	0,263 a	0,150 a	272,0 c	11,1 b	5,2 b	350,0 a	524,0 a
Sabiá	13,8 a	1,5 ab	0,3 a	0,400 a	0,200 a	318,6 b	12,8 b	10,6 a	305,0 a	387,0 ab
Capoeira	7,4 ab	1,8 a	0,3 a	0,400 a	0,288 a	382,2 a	15,9 a	9,0 ab	441,0 a	286,0 b
Pastagem	2,0 b	0,5 c	0,5 a	0,375 a	0,263 a	332,9 b	10,4 b	5,5 b	348,0 a	234,0 b
CV%	54,5	30,7	44,6	36,8	33,6	14,7	22,2	44,2	38,9	42,7

Coberturas	C:N	Polifenol:N	Celulose:N	Lignina +celulose:N	Lignina +polifenol:N
Acácia	24,5 b	0,5 a	4,8 a	79,3 a	31,8 a
Sabiá	25,6 b	0,9 a	3,1 b	55,6 b	25,4 a
Capoeira	24,5 b	0,6 a	1,8 b	46,6 b	29,1 a
Pastagem	32,1 a	0,5 a	2,2 b	56,0 b	34,0 a
CV%	17,3	44,0	34,2	24,2	37,3

Médias seguidas de pelo menos uma mesma letra em cada coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan em nível de 5% de probabilidade.

CV: coeficiente de variação; Ca: cálcio; Mg: magnésio; P: fósforo; K: potássio; Na: sódio; C-org: carbono orgânico; Ntotal: nitrogênio total; C:N: relação entre carbono orgânico e nitrogênio total; polifenol:N: relação entre polifenóis totais e nitrogênio total; celulose:N: relação entre celulose e nitrogênio total; lignina+celulose:N: relação entre lignina mais celulose e nitrogênio total; lignina+polifenol:N: relação entre lignina mais polifenol e nitrogênio total.

6.1.4. CONCLUSÕES

A acácia e o sabiá revelaram-se promissoras em melhorar a fertilidade do solo, no que tange ao Ca, Mg, SB, pH e redução dos níveis de Al no solo.

A qualidade nutricional e orgânica da serapilheira influenciou a atividade nitrificadora e desnitrificadora do solo.

As áreas de plantio de leguminosas aportaram maior quantidade de nitrogênio.

A disponibilidade do carbono foi um fator importante no controle do processo de desnitrificação que tem sua expressão relacionada com a disponibilidade de N na forma de nitrato.

Os atributos químicos e as atividades microbiológicas dos solos estudados podem ser considerados bons indicadores da recuperação de áreas degradadas.

6.1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aber, J.D.; Melillo, J. M. (1980) Litter decomposition: measuring relative contributions of organic matter and nitrogen to forest soils. *Canadian Journal of Botany*, 58, p.416-421.
- Alcântara, R.M.C.M. de. (1995) Propriedades químicas e bioquímicas e suas interrelações em solos sob vegetação de mata e campo adjacentes. Lavras: UFLA, 1995. 84p. (Dissertação tese de Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas).
- Alfaia, S.S. (1997) Mineralização do nitrogênio incorporado como material vegetal em três solos da Amazônia Central. *Rev. Bras. Ci. Solo*, Viçosa, v. 21, n. 3, p.387-392.
- Alvarez V., V.H.; Novais, R. F.; Barros, N. F.; Cantarutti, R. B.; Lopes, A. S. (1999) Interpretação dos resultados das análises de solos. In: *Ribeiro, A. C.; Guimarães, P. T. G.; Alvarez V., V. H. (Ed.). Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais – 5. Aproximação*. Viçosa, MG: CFSEMG, p. 25-32.
- Anderson, J.P.E.; Domsch, K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 10, p.215-221.
- Anderson, J.M. e Spencer, T. (1991) Carbon, nutrient and water balances of tropical rain forest ecosystems subject to disturbance. *MAB Digest* 7, UNESCO, Paris, 95p.
- Anderson, T.H.; Domsch, K.H. (1993) The metabolic quotient for CO₂ (qCO₂) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 25 (3): 393-395.
- Anderson, J. D., Ingram, J. S. I. (1996) Tropical soil biology and fertility. In: *A handbook of methods*. 2. ed. Wallingford, UK CAB International, 171p.
- Andrade, A.G., Costa, G.S., Faria, S.M. (2000) Deposição e decomposição da serapilheira em povoamentos de *Mimosa caesalpinifolia*, *Acacia mangium* e *Acacia holosericea* com quatro anos de idade em plantossolo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.24, n.6, p.777-785.
- Aulakh, M.S.; Doran, J.W.; Mosier, A.R. (1992) Soil denitrification - significance, measurement, and effects of management. *Adv. Soil Sci.*, 18, p.1-57.
- Baird, C. (2002) *Química Ambiental*. Porto Alegre, Bookman, 622p.

- Ball, A.S., Milne, E., Drake, B.G. (2000) Elevated atmospheric-carbon dioxide concentration increases soil respiration in a mid-successional lowland forest. *Soil Biology & Biochemistry*, 32, p.721-723.
- Balieiro, F.C.; Franco, A.A.; Pereira, M.G.; Campello, E.F.C.; Dias, L.E; Faria, S.M.; Alves, B.J.R. (2004) Dinâmica da serrapilheira e transferência de nitrogênio ao solo, em plantios de *pseudosamanea guachapele* e *Eucalyptus grandis* *Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 39, n.6, p. 597-601.
- Barreto, A. C.; Fernandes, M. F. (2001) Cultivo de *Gliricidia sepium* e *Leucaena leucocephala* em alamedas visando a melhoria dos solos dos tabuleiros costeiros. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, DF, v. 36, n. 10, p. 1287-1293.
- Barros, N.F.de; Comerford, N.B. (2002) Sustentabilidade da produção de florestas plantadas na região tropical. In: Alvarez V.; Schaefer, C.E.G.R.; Barros, N.F.de; Costa, L.M. da; eds. *Tópicos em Ciência do solo*. Viçosa, SBCS, p.487-592.
- Bataglia, O.C.; Furlani, A.M.C.; Teixeira, J.P.F.; Furlani, P.R.; Gallo, J.R. (1983) Métodos de análise química de plantas. Campinas, Instituto Agrônomo, 48p. (Boletim Técnico, 78)
- Braga, J.M., Defelipo, B.V. (1974) Determinação espectrofotométrica de fósforo em extrato de solo e material vegetal. *R.Ceres*, 21, p.73-85.
- Brookes, P.C. (1995) The use of microbial parameters in soil pollution by heavy metals. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v.19, n.4, p.269-279.
- Burle, M.L.; Mielniczuk, J.; Focchi, S. (1997) Effect of cropping systems on soil chemical characteristics with emphasis on soil acidification. *Plant Soil*, v.190, p.309-316.
- Camargo, F. A. O., Gianello, C.; Tedesco, M. J., Vidor, C. (1999) Nitrogênio orgânico no solo, p 117 - 137. In: Santos, G. A.; Camargo, F. A. O. *Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais*. Porto Alegre: Gênese, p.118-133.
- Carmo, J. B.; Andrade, C.A.; Cerri, C.C.; Piccolo, M.C. (2005) Disponibilidade de nitrogênio e fluxos N₂O a partir de solo sob pastagem após aplicação de herbicidas *Rev. Bras. Ci. Solo*, v.29, p.735-746.
- Chadwick, O.A., Derry, L.A., Vitousek, P.M., Huebert, B.J., Hedin, L.O. (1999) Changing sources of nutrients during four million years of ecosystem development. *Nature* 397, p.491-497.
- Constantinides, M., Fownes, J.H. (1994) Nitrogen mineralization from leaves and litter of tropical plants: relationship to nitrogen, lignin and soluble polyphenol concentrations. *Soil Biochem.*, 26, p.49-55.

- Costa, G.S., Andrade, A.G., Faria, S.M. de (1997) Aporte de nutrientes pela serapilheira de *Mimosa Caesalpinifolia* (Sabia) com seis anos de idade. Anais do III Simposio Nacional de Recuperação de Areas degradadas, Ouro Preto-MG, p.344-349.
- Coûteaux, M.M, Bottner, P., Berg, B. (1995) Litter decomposition, climate and litter quality. *Trends in Ecology & Evolution*, 10, p.63-66.
- Davies, R.I.; Coulson, C.B.; Lewis, D.A. (1964) Polyphenols in plant humus and soil: 3. *J. Soil Sci.*;15:229-309.
- Defelipo, B.V., Ribeiro, A.C. (1981) Análise química do solo. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 17p. (Boletim de Extensão, 29)
- D'Haene, K.; Moreels, E.; De Neve, S.; Daguilar, B.C.; Boecky, P.; Hofman, G.; Cleemput, O.V. (2003) Soil properties influencing the denitrification potencial of Flemish agricultural soils. *Biol. Fertil. Soils*, 38, p.358-366.
- Duguma, B.; Kang, B.T.; Okali, D.U.U. (1988) Effect of liming and phosphorus application on performance of *Leucaena leucocephala* in acid soils. *Plant and Soil*, Dordrecht, v.110, p.57-61.
- Ecosystemas (2001) Caatinga, Lojinha do wwf- webmaster@conservatio.org
- Embrapa. (1997) Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos. Manual de Métodos de Análise de Solos. 2. ed. Rev. Atual. Rio de Janeiro, SNLCS.
- Forreter, D.I., Bauhus, J., Khanna, P.K., (2004) Growth dynamics in a mixed-species plantation of *Eucalyptus globulus* and *Acacia mearnsii*. *Forest Ecology and Management*, v.193, p.81-95.
- Forreter, D.I., Bauhus, J., Cowie, A.L. (2005) On the success and failure of mixed-species tree plantations: lessons learned from o model system of *Eucalyptus globulus* and *Acacia mearnsii*. *Forest Ecology and Management*, v.209, p.147-155.
- Franco, A.A.; Dias, L.E.; Faria, S. M.; Campello, E.F.C.; Silva, E.M.R. (1995) Uso de leguminosas florestais noduladas e micorrizadas como agentes de recuperação e manutenção da vida do solo: um modelo tecnológico. *Oecol. Bras.*, 1, p.459-467.
- Franco, A.A., Faria, S.M. (1997) The contribution of N₂-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. *Soil Biochem.*, 29, p.897-983.
- Froufe, L.C.M (2003) Decomposição de folhas de plantios de eucalipto e pupunha em un fragmento da Mata Atlântica no Norte Fluminense. 142f. Tese (Doutorado em produção vegetal). UENF. Campos dos Goytacazes-RJ.

- Gama-Rodrigues, E.F.; Barros, N.F.; Gama-Rodrigues, A.C.; Santos, G.A. (2005) Nitrogênio, carbono e atividade da biomassa microbiana do solo em plantações de eucalipto. *R. Bras. Ci. Solo*, 29, p.893-901.
- Giacomini, S.J., Jantalia, C.P., Aita, C., Urquiaga, S.S., Alves, B.J.R. (2006) Emissão de óxido nítrico com a aplicação de dejetos líquidos de suínos em solo sob plantio direto. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.41, n.11, p.1653-1661.
- Goi, S. R.; Sprent, J. I.; Jacob-Neto, J. (1997) Effect of different sources of N on the structure of *Mimosa caesalpiniaefolia* root nodules. *Soil Biol. Biochem.* 29, p.983-987.
- Goi, S. R.; Sprent, J. I.; James, E. K.; Jacob-Neto, J. (1992) Influence of nitrogen form on the nitrogen fixation of *Acacia auriculiformis*. *Symbiosis*, 82, p.505-512.
- Grisi, B. M. (1995) Biomassa e a atividade de microorganismos do solo: revisão metodológica. *Revista Nordestina de Biologia*, 10: p.1-22.
- Hamilton, J.G., Thomas, R.B., Delucia, E.H. (2001) Direct and indirect effects of elevated CO₂ on leaf respiration in a forest ecosystem. *Plant Cell environment*, 24, p.975-982.
- Hardy, R. W. F., Holsten, R.D., Jackson, E.K., Burns, R.C. (1968) The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology* 43, p.1185-1207.
- Hart, S.C.; Stark, J.M.; Davidson, E.A.; Firestone, M.K. (1994) Nitrogen mineralization, immobilization and nitrification. In: Weaver, R.W. (ed.) *Methods of soil analysis. Part 2: Microbiological and Biochemical Properties*. Soil Science Society of America, Inc. p. 985-1017.
- Hedin, L.O., Vitousek, P.M., Matson, P.A. (2003) Pathways and implications of nutrient losses during four million years of tropical forest ecosystem development. *Ecology* 84 (9), p.2231-2255
- Jetten, M.S.M.; Strous, M.; Van De Pas-Schoonen, K.T.; Schalk, J.; Van Dongen, U.G.J.M.; Van De Graaf, A. A.; Logemann, S.; Muyzer, G.; Van Loosdrecht, M.C.M.; Kuenen, J.G.. (1999) The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiology Reviews* 22, p. 421-43.
- Jetten, M.S.M.; Sliemers, A. O.; Third, K. A.; Abma, W.; Kuenen, J.G.. (2003) Canon and Anammox in a gas-lift reactor. *FEMS Microbiology Letters* 218, p. 339-344. 2003.
- Kannegiesser, U. (1990) Apuntes sobre algunas acacias australianas. 1.-*Acacia mearnsii* De Willd. *Ciencia e Investigación Forestal*, v.4, n.2, p.198-202.
- Keller, M.; Veldkamp, E.; Weitz, A.M.; Reiners, W.A. (1993) Effect of pasture age on soil trace-gas emissions from a deforested area of Costa Rica. *Nature*, 365:244-246.

- Kroeze, C. (1993) Global warming by halocarbons and nitrous oxide. PhD Thesis, University of Amsterdam, p.187.
- Leita, L.; Nobile, M; de; Muhlbachova, G.; Mondoni, C.; Marchiol, L.; Zerbi, G. (1995) Bioavailability and effects of heavy metals on soil microbial biomass survival during laboratory incubation. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v.19, n.2-3, p.103-108.
- Lensi, R., Mazurie, S., Gourbiere, F., Josserand, A. (1986) Rapid determination of the nitrification potential of an acid forest soil and assessment of its variability. *Soil Biology and Biochemistry* 18, p.239-240.
- López, A., Jesus, H.S. de, Rocha, M. de M, Fries, M., Urquiaga, S., Alves, B.J.R. (1998) Diagnóstico do Potencial de Nitrificação e Desnitrificação em Solo sob Pastagens de *Bracharia* sp. e Solo sob Plantio Direto e Convencional. *Seropédica: Embrapa Agrobiologia*, nov.1998. 24p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 78)
- Louzada, M.A.P.; Quintela, M.F.S.; Penna, L.P.S. (1995) Estudo comparativo da produção de serapilheira em áreas de Mata Atlântica, floresta secundária "antiga" e uma floresta secundária (capoeira). *Oec. Bras.*, 1:61-74.
- Marchiori Jr. M.; Melo, W.J. (1999) Carbono, carbono da biomassa microbiana e atividade enzimática em um solo sob mata natural, pastagem e cultura do algodoeiro. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 23, p.257-263.
- Matson, P.A.; Vitousek, P.M.; Ewel, J.J.; Robertson, G.P. (1987) Nitrogen Transformations Following Tropical Forest Felling and Burning of a Volcanic Soil. *Ecology*, 68: p.491-502.
- Melillo, J.M.; Steudler, P.A.; Feigl, B.J.; Neill, C.; Garcia, D.; Piccolo, M.C.; Cerri, C.; Tian, H. (2001) Nitrous oxide emissions from forests and pasture of various ages in the Brazilian Amazon. *J. Geophys. Res.*, 106:179- 188.
- Melloni, R.; Pereira, E. G.; Trannin, I. C. B.; Santos, D. R. dos; Moreira, F. M. S.; Siqueira, J. O. (2001) Características biológicas de solos sob mata ciliar e campo cerrado no sul de Minas Gerais. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 25, n. 1, p. 7-13.
- Minchin, F. R., Witty, J.F., Mytton, L.R. (1994) Reply to "Measurement of nitrogenase activity in legume root nodules: in defence of the acetylene reduction assay." *Plant and Soil* 158, p.163-167.
- Monteiro, M. T. (2001) Carbono, Nitrogênio e Atividade da Biomassa Microbiana: indicadores de Qualidade do Solo e da Serapilheira em Sítios Florestais do Norte Fluminense. Campos dos Goytacazes, Universidade Estadual do Norte Fluminense, 75p. (Tese de Mestrado)
- Monteiro, M. T., Gama-Rodrigues, E.F. (2004) Carbono, nitrogênio e atividade da biomassa microbiana em diferentes estruturas de serapilheira de uma floresta natural. *R. Bras. Ci. Solo*, 28, p.819-826.

- Moraes, J.F.L. (1991) Conteúdos de carbono e tipologia de horizontes nos solos da bacia Amazônica. Piracicaba: CENA/USP, 1991. 84p. Dissertação de Mestrado.
- Marscher, H., Römheld, V. (1983) In vivo measurement of root-induced pH changes at the soil-root interface: effect of plant species and nitrogen source, *Zeitschrift fur Pflanzenernahrung und Bodenkunde*. 111, p.241-251.
- Moreira, F.M.S., Siqueira, J.O. (2002) *Microbiologia e bioquímica do Solo. Minas Gerais*, p.231-232.
- Ndaw, S.M. (2003) Diversidade, biomassa e atividade microbiana como indicadores de qualidade do solo e da serapilheira em sítios sob diferentes coberturas vegetais na região Norte Fluminense. Campos dos Goytacazes, Universidade Estadual do Norte Fluminense, 98p. (Tese de Mestrado)
- Neill, C.; Garcia-Montiel, D.C.; Piccolo, M.C.; Cerri, C.; Steudler, P.A.; Melillo, J.M.; Brito, M. (1997) Net nitrogen mineralization rates in soils following deforestation for pasture across the southwestern Brazilian Amazon Basin Landscape. *Oecologia*, 110:243-252.
- Neill, C.; Garcia-Montiel, D.C.; Piccolo, M.C.; Steudler, P.A.; Melillo, J.M.; Feigl, B.J.; Cerri, C. (1995) Nitrogen dynamics in soils of forest and active pasture in the western Brazilian Amazon basin. *Soil Biol. Biochem.*, 27:1167-1175.
- Oliveira, R.R.; Lacerda, L.D. (1993) Produção e composição química da serapilheira na Floresta da Tijuca (RJ). *R. Brasil. Bot.*, 16:93-99.
- Patra, A. K., Abbadie, L., Clays-Josserand, A., Degrange, V., Grayston, S. J., Loiseau, P., Louault, F., Mahmood, S., Nazaret, S., Philippot, L., Poly, F., Prosser, J. I., Richaume, A., Le Roux, X. (2005) Effects of Grazing on microbial functional groups involved in soil dynamics. *Ecological Monographs*, 75, p.65-80.
- Paul, E.A.; Clark, F.E. (1989) *Soil microbiology and biochemistry*. San Diego: Academic Press, 1989. 273p.
- Piccolo, M.C.; Neill, C.; Cerri, C. (1994) Net Mineralization and Net Nitrification Along a Tropical Forest-to-Pasture Chronosequence. *Plant and Soil* 162: p. 61-70.
- Pinto, C. (2001) Contribuição de espécies arbóreas de diferentes fases sucessionais da Floresta Ombrófila Densa das Terras Baixas para ciclagem de nutrientes minerais, Floresta Estadual do Palmito, Paranaguá, PR. Curitiba, 2001. 68p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal), Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.
- Pompéia, S. L. (1994) Procedimentos técnicos para recuperação de áreas degradadas por poluição. In: I Simpósio Sul-Americano e II Simpósio

- Nacional de recuperação de Áreas degradadas. Curitiba. Anais...Curitiba. 679p.
- Postgate, J. R. The fundamentals of nitrogen fixation. (1987) Cambridge: Cambridge University Press, 252p.
- Raven, J.A., Franco, A.A., Jesus, E.L. de, Jacob-Neto, J. (1990) H⁺ extrusion and organic acid synthesis in N₂-fixing symbioses involving vascular plants. *New phytologist*, 114, p.369-389.
- Reiners, W.A.; Bouwman, A.F.; Parsons, W.F.J.; Keller, M. (1994) Tropical rain forest conversion to pasture: Changes in vegetation and soil properties. *Ecol. Appl.*, 4:363- 377.
- Rigaud, J. ; Puppo. A. (1977) Effect of nitrite upon leghaemoglobin and interaction with nitrogen fixation. *Biochem. Biophys. Acta*, 497, p.702-706.
- Ross, D.J. Speir, T.W.; Kettles, H.A.; Tate, K.R.; Mackay, A.D. (1995) Soil Microbial Biomass, C and N Mineralization. And Enzyme Activities in Hill Pasture: Influence of Grazing Management. *Australian Journal of Soil Research*, 33: p.943-959.
- Santos, D.R. dos (2000) Fósforo, fungo micorrízico e Azorhizobium na produção de fitomassa e nutrição de *Sesbania virgata* e *Sesbania rostrata*. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Solo e Nutrição de Planta), Lavras-MG, Universidade Federal de Lavras, MG, 88p.
- Silva, I.F.; Mielniczuk, J. (1997) Avaliação do estado de agregação do solo afetado pelo uso agrícola. *Rev Bras Ci Solo*, v.21, p.313-319.
- Siqueira, J. O., Franco, A. A (1988) Biotecnologia do solo: Fundamentos e Perspectivas. 1nd. MEC/ESAL/FAEPE/ABEAS/, D.F., Brasília, 236p.
- Sliemers, A. O.; Derwort, N.; Campos Gomes, J.L.; Strous, M.; Kuenen, J.G.; Jetten, M.S.S.. (2002) Completely Autotrophic Nitrogen Removal over Nitrite in one Single Reactor. *Water Research* 36, p. 2475-2482.
- Smith, M.S., Tiedje, J.M. (1979) The effects of roots on soil denitrification. *Soil. Sci. Soc. Am. J.*, 43: p.951-955.
- Souza, I.M.Z. (2005) Carbono e nitrogênio da biomassa microbiana do solo em áreas reflorestadas comparadas ao campo e mata nativa do Planalto dos Campos Gerais, SC. Lages: UDESC, 2005. 61p. (Dissertação tese de Mestrado em Ciência do Solo).
- Stevenson, F.J. (1994) Organics forms of soil nitrogen. In: *Humus chemistry; genesis, composition, reactions*. 2.ed. New York, John Wiley & Sons, p.59-95.
- Stuedler, P.A.; Melillo, J.M.; Bowden, R.D.; Castro, M.S. (1991) The Effects of Natural and Human Disturbances on Soil Nitrogen Dynamics and Trace Gas Fluxes in a Puerto Rican Wet Forest. *Biotropica*, 23 (4): p.356-363.

- Stewart, G.R.; Pates, J.S.; Unkovich, M. (1993) Characteristics of inorganic nitrogen assimilation of plants in fire-prone Mediterranean type vegetation. *Plant, cell and environment* 16, p.351-363.
- Stouthamer, A.H.; Van'T riet, J.A., Oltmann, L.F. (1980) Respiration of nitrate as acceptor. In: Knowles, C.J., ed. *Diversity in bacterial respiratory systems*. Boca Raton, CRC Press, v.2, p.19-48.
- Tedesco, M.J., Gianello, C., Bissani, C.A., Bohnen, H. & Volkweiss, S.J. (1995) *Análise do Solo, Plantas e Outras Materiais UFRS*, Porto Alegre, 174p.
- Testa, V.M.; Teixeira, L.A.J.; Mielniczuk, J. (1992) Características químicas de um Podzólico Vermelho-Escuro afetadas por sistemas de cultura. *Rev Bras Ci Solo*, v.16, p.107-114.
- Thirukkumaran, C.M., Parkinson, D. (2000) Microbial respiration, biomass, metabolic quotient and litter decomposition in a lodgepole pine forest floor amended with nitrogen and phosphorus fertilizers. *Soil Biology & biochemistry*, 32, p.59-66.
- Tian, G.; Tang, B.C.; Brussaard, L. (1992) Biological effects of plant residues with contrasting chemical compositions under tropical conditions- decomposition and nutrient release. *Soil Biol. Biochem.*, 24, p.1051-1060.
- Tian, G., Brussaard, L., Kang, B.T. (1995) An index for assessing the quality of plant residues and evaluating their effects on soil and crop in the (sub-) humid tropics. *Appl. Soil Ecol.*, 2, p.25-32.
- Tiedje, J.M. (1988) Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In: Alexander, J.B.Z., ed. *Biology of anaerobic organisms*. New York, John Wiley, 1988. p.179-244.
- Tiedje, J. M., Simkins, S., Groffman, P.M. (1989) Perspectives on measurement of denitrification in the field including recommended protocols for acetylene based methods. *Plant and Soil* 115, p.261-284.
- Tomé Júnior, B. (1997) *Manual para interpretação de análise de solo*. Guaíba: Agropecuária. 247p.
- Turco, R. F.; Kennedy, A. C.; Jawson, M. D. (1994) Microbial indicators of soil quality. In: Doran, J. W.; Coleman, D. C.; Bezdicek, D. F.; Stewart, B. A. *Defining soil quality for a sustainable environment*. Madison: SSSA.
- Turner, G. L., Gibson, A.H. (1980) Pages 111–138 in F. Bergersen, editor. *Methods for evaluating biological nitrogen fixation*. John Wiley and Sons, Chichester, UK. Vessey, J. K. 1994. Measurement of nitrogenase activity in legume root nodules: in defense of the acetylene reduction assay. *Plant and Soil* 158, p.151-162.

- Van Soest, P., Wine, R. H. (1968) Development of a comprehensive system of feed analysis and its applications to forages. *J. Assoc. Official Agr. Chem.*, Madison, 51: p.780-785.
- Vanlauwe, B.; Diels, J.; Sanginga, N., Merckx, R. (1997) Residue quality and decomposition: An unsteady relationship? In: CADISCH, G. & GILLER, K.E., eds. *Driven by nature: Plant litter quality and decomposition*. Wallingford, CAB International, 1997. p.157-166.
- Vargas, L.K.; Scholles, D. (2000) Biomassa microbiana e produção de C-CO₂ e N mineral de um Podzólico Vermelhoescuro submetido a diferentes sistemas de manejo. *Rev Bras Ci Solo*, v.24, p.35-42, 2000.
- Veen, J.A.; Van Overbeek, L.S.; Van Elsas, J.D. (1997). Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiology and Molecular Biology Review* v.61 pp. 121-135.
- Veldkamp, E. (1994) Organic carbon turnover in tropical soils under pastures after deforestation. *Soil Science Society of America. Journal*, v.58, p.175-180.
- Veldkamp, E.; Davidson, E.; Erickson, H.; Keller, M.; Weitz, A. (1999) Soil Nitrogen Cycling and Nitrogen Oxide Emissions Along a Pasture Chronosequence in the Humid Tropics of Costa Rica. *Soil Biology and Biochemistry*, 31: p.387-394.
- Verchot, L.V.; Davidson, E.A.; Cattânio, J.H.; Ackerman, I.L.; Erickson, H.E.; Keller, M. (1999) Land use change and biogeochemical controls of nitrogen emissions from soil in eastern Amazon. *Global Biogeochem. Cycles*, 13:31-46.
- Vessey, J. K.; Waterer, J. (1992) In search of the mechanism of nitrate inhibition of nitrogenase activity in legume nodules: recent developments. *Physiol. Plant.*, 84, p.171-176.
- Vessey, J. K. (1994) Measurement of nitrogenase activity in legume root nodules: in defense of the acetylene reduction assay. *Plant and Soil*, 158:151-162.
- Vitousek, P.; Gosz, J.R.; Grier, C.C.; Melillo, J.M.; Reiners, W.A.; Todo, R.L. (1982) A comparative analysis of potential nitrification and nitrate mobility in forest ecosystems. *Ecological Monographs*, 52, p.155-177.
- Wander, M. M.; Traina, B.R. (1994) Organic and conventional management effects on biologically active soil organic matter pools. *Soil Science Society of America Journal*, 58, p.1130-1139.
- Wormald, T.J. *Mixed and pure forest plantations in the tropics and subtropics*. FAO Forestry Paper 103. Rome, FAO Technical Papers. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1992. 152p.

Ye, R.W.; Thomas, S.M.. (2001) "Microbial nitrogen cycles: physiology, genomics and application". *Current Opinion in Microbiology*, 4 p. 307-312.

Yoshinari, T., Hynes, R., Knowles, R. (1977) Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction and measurement of denitrification and nitrogen fixation in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 9:p.177-183.

6.2. DIVERSIDADE ESTRUTURAL E FUNCIONAL DE MICRORGANISMOS EM SOLOS SOB DIFERENTES COBERTURAS VEGETAIS

Resumo

Métodos tradicionais de isolamento e cultivos limitam as análises da diversidade microbiana no meio ambiente, pois acredita-se que aproximadamente 10% dos microrganismos possam ser cultivados. Uma nova perspectiva surgiu com o advento da biologia molecular, que tem permitido interpretar mais facilmente e de forma mais sensível a diversidade estrutural e funcional dos microrganismos no solo. Este trabalho foi desenvolvido na Fazenda Carrapeta, Conceição de Macabú-RJ, com o objetivo de estimar e comparar a diversidade de comunidades bacterianas em duas áreas reflorestadas com leguminosas arbóreas (*Acácia auriculiformis* (acácia) e *Mimosa caesalpinifolia* (sabiá)), comparadas às áreas de capoeira e pastagem. Para tanto, coletaram-se quatro amostras, compostas de quinze subamostras de solo na profundidade de 0-10cm, e quatro amostras simples de serapilheira, em cada área, em setembro de 2005. O perfil molecular da comunidade microbiana foi determinado por DGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente de

Desnaturantes), extraindo-se o DNA diretamente e submetendo-o à reação de PCR (polimerase em cadeia) com os iniciadores das regiões, 16S do DNA ribossomal para a comunidade bacteriana total, *CTO* para a comunidade bacteriana nitrificadora e *Nirk* para a comunidade bacteriana desnitrificadora. A capoeira apresentou o menor índice de diversidade bacteriana do solo em relação ao polimorfismo do 16S do DNA devido, provavelmente, aos baixos teores de carbono e os possíveis efeitos sobre as estruturas das comunidades bacterianas decorrentes das atividades antrópicas nos demais solos. Os maiores valores de índices de diversidade da comunidade de bactérias desnitrificadoras da serapilheira foram encontrados na acácia e no sabiá estatisticamente iguais entre si e o menor valor de índice na pastagem; a capoeira apresentou os valores intermédios, não diferindo com o sabiá. A análise de agrupamento com base no perfil dos géis de DGGE, mostrou efeitos diferenciais do tipo de coberturas vegetais sobre as estruturas genéticas das comunidades bacterianas. As estruturas genéticas da comunidade microbiana total do solo e da serapilheira foram expressivamente influenciadas pela qualidade química e nutricional da serapilheira e pela fertilidade do solo. Em relação às comunidades bacterianas nitrificadoras do solo, a capoeira e a acácia apresentaram a mesma estrutura genética, indicando sucessão microbiana no solo sob esta leguminosa. Já para as estruturas das comunidades bacterianas desnitrificadoras do solo, necessita-se de mais estudos para elucidar o agrupamento da capoeira junto a pastagem. Os iniciadores usados neste trabalho para amplificar os genes *AOB* e *Nirk*, não produziram resultados com sensibilidade e especificidade suficientes para detectar as alterações das populações de bactérias nitrificadoras e desnitrificadoras da serapilheira.

Palavras chave: diversidade microbiana, leguminosas arbóreas, sucessão microbiana, estruturas genéticas.

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL DIVERSITY OF SOIL MICROORGANISMS IN SOILS UNDER DIFFERENT PLANT COVER

ABSTRACT

Traditional methods of isolation and culture limits the analyses of the microbial diversity in the environment, it is believed that approximately 10% of these microorganisms can be cultivated. Nevertheless, a new perspective is emerging due to the progresses of molecular biology, allowing the interpretation of structural and functional diversity of soil microorganisms in an easier and more sensitive way. This research was developed in Carrapeta farm, Conceição de Macabú-RJ, to compare and estimate the diversity of bacterial communities, in the soil of four areas, which are: two reforested areas with legume trees (*Acacia auriculiformis* (acácia) and *Mimosa caesalpinifolia* (sabiá)), regenerating secondary forest (capoeira) and pasture. The soil (four replicate samples composed of fifteen sub-samples each, from a depth of 0-10 cm) and litter (four samples) were collected in September 2005. The genetic structure of the total bacterial community was assessed by coupling PCR amplification of specific 16S rDNA targets, from soil DNA extracts, with the use of denaturing

gradient gel electrophoresis (DGGE). The genetic structures of the ammonia-oxidizing (nitrifiers) and nitrate-reducing (denitrifiers) communities were characterized by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) targeting group-specific genes (*CTO* and *Nirk*, respectively). The soil under regenerating secondary forest showed the lowest bacterial diversity indexes in relation to the 16S DNAr, probably due to the lowest soil carbon contents and anthropical effects on bacterial community genetic structure in the other areas. The highest diversity indexes of denitrifiers were detected in the litter samples collected in legume trees (acácia and sabiá), while the pasture had the lowest value. The indexes values of capoeira and sabiá areas did not present significant differences. The analysis Plymouth Routine in Multivariate Ecological Research (*Primer*) revealed plant effects on microbial communities. The soil fertility, nutritional and organic litter quality influenced the genetic structure of the total bacterial community. In relation to nitrifiers, similar genetic structures were obtained among the soil samples collected in capoeira acácia areas, indicating bacterial succession in the reforested area with this legume tree. Already for the denitrifiers communities, more targeted studies are needed to elucidate the similar genetic structures between capoeira and pasture areas. The primers used in this study, targeting the AOB and NirK genes, showed low sensibility and specificity to detect the alterations of the nitrifiers and denitrifiers communities in the litter samples.

Keywords: microbial diversity, legume trees, bacterial succession, genetic structures.

6.2.1 INTRODUÇÃO

Até pouco tempo atrás, a maioria dos estudos de qualidade do solo era relacionada à utilização de indicadores físicos e químicos do solo (Doran et al., 1994). No entanto, embora muito útil para estimar o potencial produtivo do solo, o uso desses atributos como indicadores de qualidade do solo é comprometido, uma vez que as alterações nos atributos físicos e químicos do solo podem levar anos para ocorrer de forma significativa, o que pode revelar tardiamente um estado de degradação do solo (Carter, 1986). Waksam (1927), investigando microrganismos e parâmetros físicos e químicos do solo, concluiu que os parâmetros biológicos (número de microrganismos, nitrificação, liberação de CO₂, decomposição da celulose, fixação biológica do nitrogênio, atividade catabólica e potencial de oxidação-redução) deveriam ser utilizados para avaliar a fertilidade do solo.

A diversidade microbiana, em virtude dos microrganismos estarem na base da cadeia trófica e diretamente envolvidos nos ciclos dos nutrientes no solo, tem sido bastante indicada como um importante indicador da qualidade do solo (Rosado, 2000; Tiedje *et al.*, 2001). Outro argumento a favor dessa característica é o fato da diversidade microbiana manter-se naturalmente inalterada ao longo do ano (Smit *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2003).

Uma maior estabilidade do sistema tem sido associada a uma alta diversidade da microbiota do solo. Nos ecossistemas com interferências humanas, práticas como uso freqüente de fogo para renovação das pastagens e cultivo do solo influenciam as populações da comunidade microbiana, principalmente através das alterações do pH e da disponibilidade de nutrientes no solo. O plantio de árvores leguminosas constitui-se uma alternativa para corrigir a acidez e a baixa fertilidade do solo, propiciando um ambiente favorável ao crescimento microbiano. Num ecossistema natural a regulação interna de funcionamento é basicamente um produto da diversidade biológica, que controla o fluxo de energia e nutrientes (Swift e Anderson, 1993). A diversidade tem um papel importante na manutenção da estrutura e função do ecossistema. Os ecossistemas naturais geralmente seguem o princípio de que mais diversidade permite maior resistência à perturbação e à interferência. Os ecossistemas com alta diversidade tendem a se recuperar mais

rapidamente da perturbação, e a restaurar o equilíbrio em seus processos de ciclagem de nutrientes e fluxo de energia; em ecossistemas com baixa diversidade, a perturbação pode provocar mais facilmente modificações permanentes no funcionamento, resultando na perda de recursos do ecossistema e em alterações na constituição de suas espécies.

O conhecimento do equilíbrio dinâmico e dos efeitos da atividade antrópica sobre as populações na comunidade bacteriana é importante, dadas as inúmeras funções que esses microrganismos desempenham. As análises de atividade e estrutura das comunidades microbianas podem trazer grande contribuição para a geração de índices de qualidade biológica do solo, que podem ser utilizados para o monitoramento dos solos manejados. Embora as pesquisas direcionadas para este tipo de informação sejam relativamente intensas em solos de regiões temperadas, ainda são incipientes em relação aos solos das regiões tropicais. No Brasil há poucos dados comparáveis entre grupos funcionais de microrganismos presentes em solos de ecossistemas naturais e em agroecossistemas.

Esse trabalho tem como objetivo estimar e comparar a diversidade de comunidades bacterianas em solos sob plantio de *Acácia auriculiformis* (acácia) e *Mimosa caesalpinifolia* (sabiá), comparadas às coberturas de capoeira e pastagem.

6.2.2. MATERIAL E MÉTODOS

As caracterizações químicas das amostras de solo e da serapilheira foram processadas conforme descritas no trabalho 1.

6.2.2.1 Extração de DNA a partir das amostras de solo e serapilheira

A extração de DNA das amostras coletadas foi realizada através do método de extração direta com o "kit" de extração de DNA para solo (PowerSoil™ DNA Isolation kit) da MOBIO (Carlsbad, California, USA). O "kit" de extração é um sistema que consegue extrair e purificar DNA de tecidos vegetais e animais, cultivos celulares, bactérias e fungos em um intervalo de tempo relativamente curto. O "Kit" é composto de um "ependorff" contendo uma matriz de lise e esferas de cerâmica (que ajudam a quebrar a parede da bactéria), filtros, seis frascos contendo soluções de lise celular específica para as amostras ambientais e um frasco contendo uma solução de purificação.

O DNA foi extraído de acordo com as instruções do fabricante, utilizando-se 0,5 g para as amostras de solo e 0,2 g para as amostras de serapilheira. A eficiência da extração foi verificada através da quantificação de DNA das amostras (Quadro 4) em espectrofotômetro Xenius, utilizando-se o kit *Picogreen*® (Molecular Probes). Foi medida a absorbância a 280 nm de comprimento de onda para verificar a presença de proteínas e calcular a pureza do DNA extraído. A razão entre as leituras DO_{260}/DO_{280} indicou um valor de pureza dentro da faixa ideal (1,8 ↔ 2,0). A razão abaixo de 1,6 indica grande quantidade de proteínas e contaminantes.

6.2.2.2. Caracterização da comunidade total de bactérias

O DNA extraído foi amplificado por PCR com os iniciadores 338f e 518r (Tabela 2), que abrangem a região V3 do DNA ribossômico 16S (Ovreas *et al.*, 1997). À extremidade 5' do primeiro "primer" (338f) foi acrescentado um grampo de GC (5'CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G, Muyzer *et al.*, 1993) para fins de utilização do produto de PCR, obtido na amplificação nos subseqüentes experimentos de DGGE. Este grampo de GC tem a função de estabilizar o comportamento de desnaturação da dupla fita de DNA durante a eletroforese em gel com agentes de desnaturantes do DGGE (Sheffield *et al.*, 1989).

Quadro 4: Concentrações dos produtos de DNA extraídos a partir das amostras de solo e serapilheira.

	Solo	Serapilheira
	ng DNA μl^{-1}	ng DNA μl^{-1}
Amostra 1 acácia	10,92	7,26
Amostra 2 acácia	8,17	7,36
Amostra 3 acácia	8,79	16,37
Amostra 4 acácia	9,42	7,05
Amostra 1 capoeira	24,32	10,03
Amostra 2 capoeira	22,84	8,91
Amostra 3 capoeira	13,53	21,24
Amostra 4 capoeira	11,84	14,25
Amostra 1 pastagem	13,59	7,15
Amostra 2 pastagem	13,11	10,52
Amostra 3 pastagem	17,31	14,82
Amostra 4 pastagem	9,13	7,52
Amostra 1 sabiá	6,25	9,41
Amostra 2 sabiá	11,89	8,19
Amostra 3 sabiá	7,77	13,15
Amostra 4 sabiá	6,86	15,34

Tabela 2: Seqüência dos iniciadores utilizados para a amplificação da comunidade total de bactérias

Iniciadores	Seqüência	Referências
338f-GC	5' - ACTCCTACGGGAGGCAGCAG - 3'	Ovreas <i>et al.</i> , 1997
518r	5' - ATTACCGCGGCTGCTGG - 3'	Ovreas <i>et al.</i> , 1997

A amplificação por PCR foi realizada em um aparelho termociclador (T personal, Biometra, Göttingen, Germany). Cada mistura de reação (volume final de 25 μl) foi constituída de 30 ng de DNA, 0,5 μM de cada *primer*, 200 μM de cada deoxinucleosídeo trifosfato, 1,5 mM de MgCl_2 , 5 μl de tampão (10X) para a enzima *Taq* DNA polimerase, 2,5 μl da proteína T4 e 2 U de *Taq* polimerase (BIOLINE). A reação consistiu de uma etapa inicial de desnaturação do DNA a 94°C por 5 min e depois foi utilizado um esquema de PCR “touchdown”, nos cinco primeiros ciclos, para minimizar a ocorrência de produtos inespecíficos (Muyzer *et al.*, 1993). Nesse esquema, a temperatura inicial de ligação dos “primers” ao DNA molde era de 10°C superior à temperatura ótima de ligação dos iniciadores (65°C) e essa temperatura foi diminuída de 1°C a cada ciclo até que a temperatura ideal (55°C) fosse atingida; então 15 ciclos adicionais foram realizados a 55°C. A extensão dos “primers” foi realizada a 72°C por 1 min a cada ciclo e uma extensão final foi feita a 72°C por 10 minutos.

O DNA amplificado foi analisado através da técnica de DGGE, utilizando-se um equipamento “D-Code™ Universal Mutation Detection System” (Bio-Rad Richmond, USA). Os produtos de PCR foram aplicados diretamente em géis contendo 8% (wt/vol) de poliacrilamida e TAE (1X). O gradiente linear de desnaturantes (uréia e formamida) foi de 30 a 60%. Os gradientes foram formados a partir de soluções estoque de poliacrilamida (8%), contendo 0 a 100% de desnaturantes (100% corresponde a 7M de uréia e 40% de formamida). O tempo de eletroforese foi de 16h a 60°C e 75V. Após a eletroforese, os géis foram corados por 30 min com SYBR Green I (Molecular Probes), fotografados sob luz UV, utilizando-se um sistema de captura de imagem “Biocapt^{MW}” (Vilber-Lourmat, France) e analisados através do programa Gel Compar II software (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

6.2.2.3. Caracterização da comunidade de bactérias nitrificadoras

A estrutura da comunidade de microrganismos amonificadores foi avaliada através das técnicas de tipagem infra-específica (PCR-DGGE). A primeira etapa da amplificação foi feita com o par de iniciadores CTO189f-GC e CTO654r (Kowalchuk *et al.*, 1997) (Tabela 3), específico para o grupo β -Proteobacteria. A segunda etapa consistiu de um *nested*-PCR, utilizando-se os iniciadores 357f-GC e 518r (Muyzer *et al.*, 1993) (Tabela 4) visando caracterizar a população de Eubactéria. As reações de PCR foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Freitag e Prosser (2003), onde um grampo de GC (Tabela 5), necessário aos experimentos de DGGE, foi adicionado aos iniciadores. O DNA amplificado foi analisado através da técnica de DGGE, como descrito no 6.2.2.2.

Tabela 3: Seqüência dos iniciadores utilizados para a amplificação do β -Proteobacteria

Iniciadores	Seqüência	Referências
CTO189f-GC	5' -GGAGRAAAGCAGGGGATCG- 3'	Freitag e Prosser, 2003
CTO654r	5' -CTAGCYTTGTAGTTTCAAACGC- 3'	Freitag e Prosser, 2003

Tabela 4: Seqüência dos iniciadores utilizados para a amplificação de Eubacteria

Iniciadores	Seqüência	Referências
357f-GC	5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCA CGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3'	Muyzer, 1993
518r	5' -GTATTACCGCGGCTGCTGG-3'	Muyzer, 1993

Tabela 5: Seqüência do grampo de GC de 33 bases utilizadas nas análises de DGGE.

Seqüência do grampo de GC	Referências
5'-CCGCCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGG-3'	Freitag e Prosser, 2003

6.2.2.4. Caracterização da comunidade de bactérias desnitrificadoras

A estrutura genética da comunidade bacteriana de vida livre, responsável pela desnitrificação de nitrogênio, foi avaliada através da técnica PCR-DGGE. Para a amplificação de fragmentos específicos do gene *nirK*, utilizou-se o método de Liu *et al.* (2003). À extremidade 5' de um dos pares de iniciadores, "reverse primer", foi acrescentado um grampo de GC para fins de utilização do produto de PCR obtido na amplificação nos subseqüentes experimentos de DGGE. Procedeu-se a 2 series de amplificações por PCR. A primeira reação consistiu de uma mistura de 30 ng de DNA, 1 μ M de cada *primer*, 200 μ M de cada deoxinucleosídeo trifosfato, 1,5 mM de MgCl₂, 5 μ l de tampão para a *Taq* DNA polimerase, 1 μ l da proteína T4 e 1,75 U de *Taq* polimerase (Qbiogene). Os amplicons resultantes desta amplificação foram utilizados como moldes para uma nova amplificação.

Os produtos de PCR resultantes foram analisados em géis contendo 6 % (wt/vol) de poliacrilamida e TAE (1X). O gradiente linear de desnaturantes (uréia e formamida) foi de 35 a 65%. Os gradientes foram formados a partir de soluções estoque de poliacrilamida (6%) contendo 0 a 100% de desnaturantes (100% corresponde a 7M de uréia e 40% de formamida). O tempo de eletroforese foi de 4 horas e 30 minutos, a 60°C e 150V.

6.2.2.5. Análises estatísticas

A análise visual dos géis de DGGE foi feita com o auxílio de índices de diversidade. Os índices escolhidos para a avaliação da diversidade genotípica das comunidades bacterianas, nas diferentes áreas, foram os de Shannon-Weaver (1949), baseada na riqueza de espécies presentes, e de Simpson (1949), baseada no grau de dominância (Odum, 1988). Esses índices são ferramentas poderosas para o estudo do comportamento da diversidade de comunidades microbianas permitindo uma avaliação da dinâmica populacional frente a diferentes manejos. Neste sentido, os índices têm sido citados como indicadores adequados para aferir os efeitos da atividade antrópica e, ou estresses ambientais numa comunidade simples, ou selecionar o melhor

exemplo fora de um grupo de habitats similares para propostas de conservação (Magurran, 1988). Além disso, esses índices apresentam cálculos simples e podem ser úteis, quando empregados em áreas delimitadas, no espaço e no tempo, e que apresentem espécies identificadas. Esses índices combinam o nº de espécies (S) e o total do nº de indivíduos (N). Neste trabalho, a riqueza de espécies foi determinada pelo número de bandas presentes em cada amostra e o total do nº de indivíduos pela intensidade das bandas. Os resultados dos índices de diversidade (Shannon e Simpson) foram submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$). As comparações de médias foram feitas através do teste de Duncan ($p \leq 0,05$), utilizando-se o pacote estatístico SAEG 9.0.

A similaridade entre as amostras também foi determinada com base na posição (altura) e presença (ou ausência) das bandas detectadas para fins de interpretação dos perfis DGGE.

Na comparação das estruturas das comunidades microbianas entre as áreas, utilizou-se a análise de escalonamento multidimensional (MDS), para as amostras. A análise de proximidade MDS é um método de ordenação multivariado, com base numa matriz de similaridade, gerando uma representação gráfica da distância entre os perfis gerados pela técnica de DGGE. O *stress* é um índice resultante da análise de MDS e representa o ajuste necessário para representar as relações entre as amostras. De acordo com Clarke e Warnick (1994), um *stress* de 0,1 corresponde a uma boa ordenação. Para averiguar se há diferenças em nível de 5% de significância entre as comunidades microbianas das diferentes coberturas em estudo, foi aplicada a análise de similaridade ANOSIM unifatorial. A matriz foi calculada através da distância euclidiana normalizada, sem transformação prévia e com padronização dos dados, seguindo as recomendações de Clarke e Warnick (1994). Estas análises foram geradas pelo pacote estatístico *Primer 5.2.9* (Plymouth Routine in Multivariate Ecological Research –Plymouth University).

A análise de agrupamento hierárquico foi feita com o programa *Primer 5.2.9*. O método “*Simple matching*” foi escolhido para a determinação da matriz de similaridade porque considera as semelhanças e diferenças entre bandas comparadas e serviu de base para a realização do dendrograma.

Calculou-se equações de regressão linear simples através do pacote estatístico SAEG 9.0 para avaliar o efeito das características químicas do solo e da serapilheira sobre a estrutura das comunidades microbianas.

6.2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da diversidade de bactérias tem sido fortemente influenciada pelo uso de técnicas moleculares. A reação da polimerase em cadeia combinada com DGGE, utilizando seqüências iniciadoras específicas para famílias, gêneros e espécies de interesse, tem sido utilizada para a análise da diversidade e da dinâmica de comunidades microbianas do solo, em função de variações ambientais e, ou antrópicas. Neste estudo, os géis obtidos a partir de amostras de solo e serapilheira coletadas nas diferentes coberturas vegetais permitiram a visualização de diferentes perfis genéticos de bactérias, evidenciando diferenças nas comunidades microbianas.

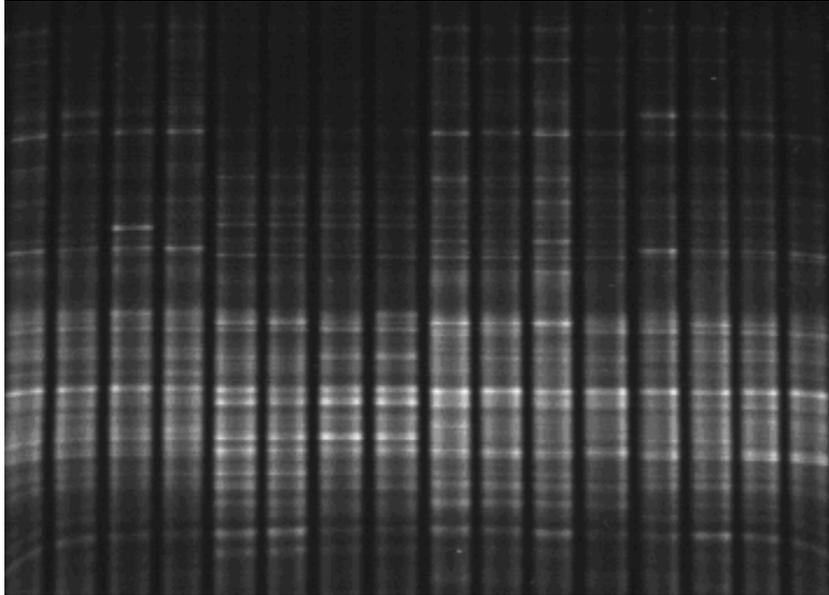
6.2.3.1. Diversidade genética e estrutura da comunidade total de bactérias nos compartimentos solo e serapilheira

6.2.3.1.1 Análise visual dos géis

A estrutura da comunidade microbiana total foi caracterizada através da análise do perfil de bandas em experimento de amplificação dos genes de 16S ribossomal e PCR-DGGE. Pela comparação dos perfis gerados entre as diferentes áreas, pode-se observar diferenças relativas à diversidade populacional (figura 6).

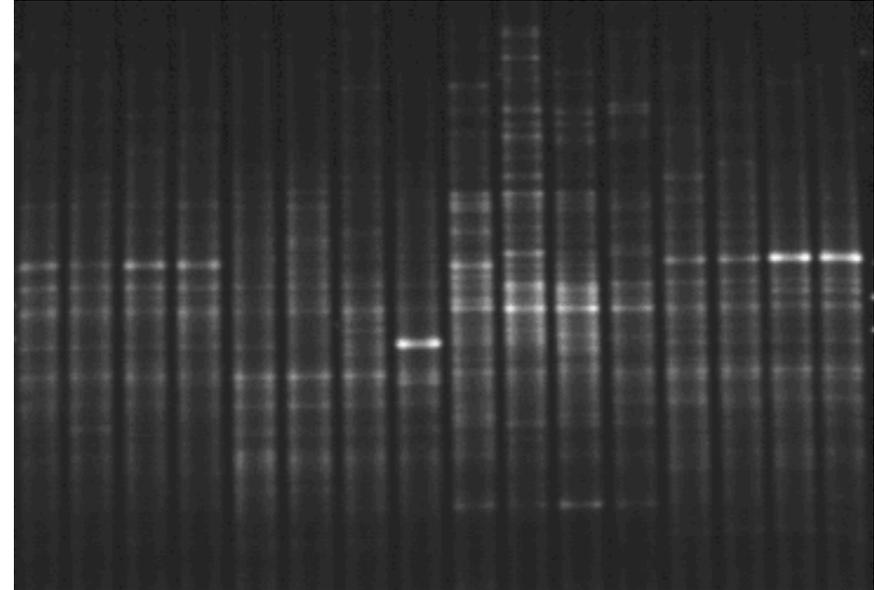
A análise dos padrões eletroforéticos revelou a presença de bandas comuns entre todas as amostras avaliadas, sendo trinta bandas para as amostras de solo e quarenta e nove para as amostras de serapilheira (Quadros 5 e 6). Doze bandas foram visualizadas apenas na acácia, pastagem e sabiá (APS) para as amostras de solo (Quadro 5), e três, para as amostras de serapilheira (Quadro 6). Considerando a capoeira como referência, foi observada, para as amostras de solo, a ausência de onze bandas na acácia (CPS), duas, na pastagem (ACS) e uma, no sabiá (ACP) (Quadro 5). Já para as amostras de serapilheira, notou-se a ausência de dez bandas na acácia (CPS), uma, na pastagem (ACS) e uma, no sabiá (ACP) (Quadro 6). Entretanto, não foi encontrada nenhuma banda específica a uma determinada área (Quadros 5 e 6), o que ressalta certa homologia entre as espécies, sugerindo que as populações de bactérias se originaram de um grupo ancestral comum.

A1 A2 A3 A4 C1 C2 C3 C4 P1 P2 P3 P4 S1 S2 S3 S4



A – Estrutura genética da comunidade bacteriana total do solo

A1 A2 A3 A4 C1 C2 C3 C4 P1 P2 P3 P4 S1 S2 S3 S4



B – Estrutura genética da comunidade bacteriana total da serapilheira

Figura 6: Perfil de bandas obtido pela análise de DGGE dos fragmentos do DNAr 16S amplificados com primers 338f e 518r , comparando amostras de solo (A) e serapilheira (B) das quatro diferentes coberturas vegetais.

A1: amostra 1 da acácia; A2: amostra 2 da acácia; A3: amostra 3 da acácia; A4: amostra 4 da acácia; C1: amostra 1 da capoeira; C2: amostra 2 da capoeira; C3: amostra 3 da capoeira; C4: amostra 4 da capoeira; P1: amostra 1 da pastagem; P2: amostra 2 da pastagem; P3: amostra 3 da pastagem; P4: amostra 4 da pastagem; S1: amostra 1 da sabiá; S2: amostra 2 da sabiá; S3: amostra 3 da sabiá e S4: amostra 4 da sabiá.

	A1	A2	A3	A4	C1	C2	C3	C4	P1	P2	P3	P4	S1	S2	S3	S4
L51	ACPS															
L52	ACPS															
L53	ACPS															
L54	ACPS															
L55	AS	AS	AS	AS									AS	AS		
L56	ACPS															
L57		APS	APS						APS							
L58	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS				ACPS
L59	ACS	ACS	ACS	ACS	ACS		ACS						ACS	ACS	ACS	ACS
L60	ACPS															
L61	ACS	ACS	ACS	ACS			ACS						ACS		ACS	ACS
L62		ACPS														
L63	AS	AS	AS													AS
L64					CPS	CPS	CPS	CPS			CPS					CPS
L65		APS	APS						APS			APS	APS	APS	APS	APS
L66	APS	APS	APS	APS								APS				APS
L67	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS										
L68					CPS											

PS: bandas presentes apenas na pastagem e no sabiá; APS: bandas presentes apenas na acácia, na pastagem e no sabiá; AP: bandas presentes apenas na acácia e na pastagem; ACPS: bandas presentes na acácia, na capoeira, na pastagem e no sabiá; AS: bandas presentes apenas na acácia e no sabiá; CPS: bandas presentes apenas na capoeira, na pastagem e no sabiá; ACS: bandas presentes apenas na acácia, na capoeira e no sabiá e uma no sabiá; ACP: bandas presentes apenas na acácia, na capoeira e no sabiá; CP: bandas presentes apenas na capoeira e na pastagem.

	A1	A2	A3	A4	C1	C2	C3	C4	P1	P2	P3	P4	S1	S2	S3	S4
L53	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS
L54			AP							AP	AP					
L55	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS
L56	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS
L57			ACPS		ACPS	ACPS	ACPS									
L58	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS			ACPS	ACPS	ACPS			ACPS	ACPS	ACPS	ACPS
L59	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS			ACPS	ACPS		ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS
L60	ACS	ACS	ACS	ACS	ACS		ACS	ACS								ACS
L61			ACPS			ACPS	ACPS		ACPS				ACPS			
L62					CS	CS									CS	CS
L63	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS										
L64		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS
L65					CPS	CPS		CPS	CPS	CPS	CPS	CPS		CPS		
L66		ACPS	ACPS			ACPS				ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS
L67		ACPS		ACPS	ACPS			ACPS			ACPS				ACPS	
L68	ACPS	ACPS			ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS					ACPS
L69		ACPS	ACPS	ACPS			ACPS			ACPS						
L70	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS				ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	

PS: bandas visualizadas apenas na pastagem e no sabiá; CPS: bandas visualizadas apenas na capoeira, na pastagem e no sabiá; APS: bandas visualizadas apenas na acácia, na pastagem e no sabiá; ACPS: bandas visualizadas na acácia, na capoeira, na pastagem e no sabiá; AP: bandas visualizadas apenas na acácia e na pastagem; ACS: bandas visualizadas apenas na acácia, na capoeira e no sabiá e uma no sabiá; AP: bandas visualizadas apenas na acácia e na pastagem; CS: bandas visualizadas apenas na capoeira e no sabiá.

A diversidade da comunidade microbiana total calculada através do índice de Shannon-Weaver foi maior nos solos sob acácia, pastagem e sabiá, e menor, na capoeira (Quadro 7), sugerindo um possível efeito do impacto ambiental sobre a comunidade bacteriana do solo (mutações genéticas, deleções, etc) causado pelo desmatamento ou tipo de uso da terra. Estes resultados são diferentes dos encontrados por Borneman e Triplett (1997) que observaram maior diversidade do 16S DNAr na comunidade microbiana do solo em área de mata nativa da Amazônia, quando comparada a uma área de pastagem. Entretanto, não foi encontrada diferença significativa entre as amostras de serapilheira (Quadro 7).

O valor do índice de Simpson foi estatisticamente igual entre as áreas estudadas (Quadro 7), revelando a ausência de dominância de espécies tanto nas amostras de solo quanto nas de serapilheira. Assim, este resultado demonstra que a dominância de espécies de microrganismos não é tão importante para a manutenção da diversidade, isso porque a abundância de algumas espécies reflete, de forma mais imediata, a flutuação microbiana de curto prazo; e a diversidade revela o equilíbrio entre os diversos organismos e os domínios funcionais no solo (Kennedy, 1999; Lavelle, 2000).

Quadro 7: Índices de diversidade dos perfis DGGE comunidade bacteriana total do solo e da serapilheira das diferentes coberturas estudadas de acordo com Shannon e com Simpson.

Sitios	Solos		Serapilheira	
	Índice de Shannon	Índice de Simpson	Índice de Shannon	Índice de Simpson
Acácia	3,2 a	0,96 a	3,0 a	0,93 a
Sabiá	3,1 a	0,94 a	3,1 a	0,91 a
Capoeira	2,9 b	0,94 a	3,0 a	0,91 a
Pastagem	3,2 a	0,95 a	3,1 a	0,94 a
CV %	3,57	1,16	8,24	4,46

Médias (de quatro repetições) seguidas de pelo menos uma mesma letra em cada coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan em nível de 5% de probabilidade. CV: coeficiente de variação.

No presente trabalho, a capoeira considerada como um solo sob uma vegetação em clímax e que não sofreu alteração recente pelo homem, apresentou as comunidades bacterianas mais adaptadas ao meio ambiente, ou seja, um sinergismo maior que as áreas sob pastagem e plantio de leguminosas. Um solo com teor elevado de matéria orgânica tende a manter a população microbiana mais estável ao longo do tempo, provavelmente, em decorrência da riqueza de nichos ecológicos, pela disponibilidade das fontes de carbono (De Fede *et al.*, 2001; Grayston *et al.*, 2001). Ao contrário, o panorama para um tal equilíbrio é quase

insignificante em ambientes “transformados”, como nos solos sob pastagem, devido à remoção dos resíduos vegetais depositados na superfície do solo. Nestes sistemas, a variação da diversidade microbiana está diretamente ligada ao regime hídrico, ao clima da região (temperatura) e à qualidade dos resíduos vegetais aportados (Rogers e Tate III, 2001; Tiedje *et al.*, 2001). A variação da diversidade microbiana é resultado da dinâmica de populações de determinados grupos de bactérias do solo, proporcionada por mecanismos de transferência e, em consequência, recombinações genéticas. O aumento na diversidade genética de bactérias na acácia e no sabiá, indica que possa existir uma correlação entre a diversidade microbiana e as espécies leguminosas. Apesar destas áreas estarem em seus primeiros estágios de sucessão, os processos biológicos fixadores de nitrogênio podem estar cooperando para uma maior disponibilidade de nutrientes para o crescimento bacteriano.

Assim, estes resultados mostram que um solo de ecossistema original pode ter um equilíbrio que um sistema com interferência antrópica não possui, existindo o consenso de que a diversidade microbiana está diretamente relacionada à estabilidade do ecossistema (Kennedy, 1999).

6.2.3.1.2. Dendrograma obtido a partir da análise dos perfis de bandas 16S-DGGE da comunidade bacteriana total do solo e da serapilheira

A partir dos géis obtidos por meio de amplificação dos genes de 16S ribossomal e PRC-DGGE, foi realizada uma análise de agrupamento com perfis das amostras das diferentes coberturas, de modo a se determinar o nível de similaridade das comunidades bacterianas características de cada uma. As matrizes de similaridade construídas procuram fornecer uma idéia global da semelhança genética das populações microbianas dentro (amostras da mesma área) e entre as diferentes coberturas. Para tanto, foi utilizado o programa *Primer* 5.2.9. que, a partir da intensidade e do número de bandas dos géis, formou grupos.

Na figura 7, encontra-se o dendrograma gerado pelo método UPGMA a partir das amostras de solo. O perfil eletroforético das bandas no DGGE revela alta similaridade entre amostras coletadas numa mesma cobertura, com 78, 74, 69 e 68% de similaridade, para acácia, capoeira, pastagem e sabiá, respectivamente. Os valores de similaridade entre áreas, foram baixos, denotando a existência de quatro grupos genotípicos: sabiá (G1), acácia (G2), capoeira (G3) e pastagem (G4), baseado na caracterização do 16S DNAr (Figura 7).

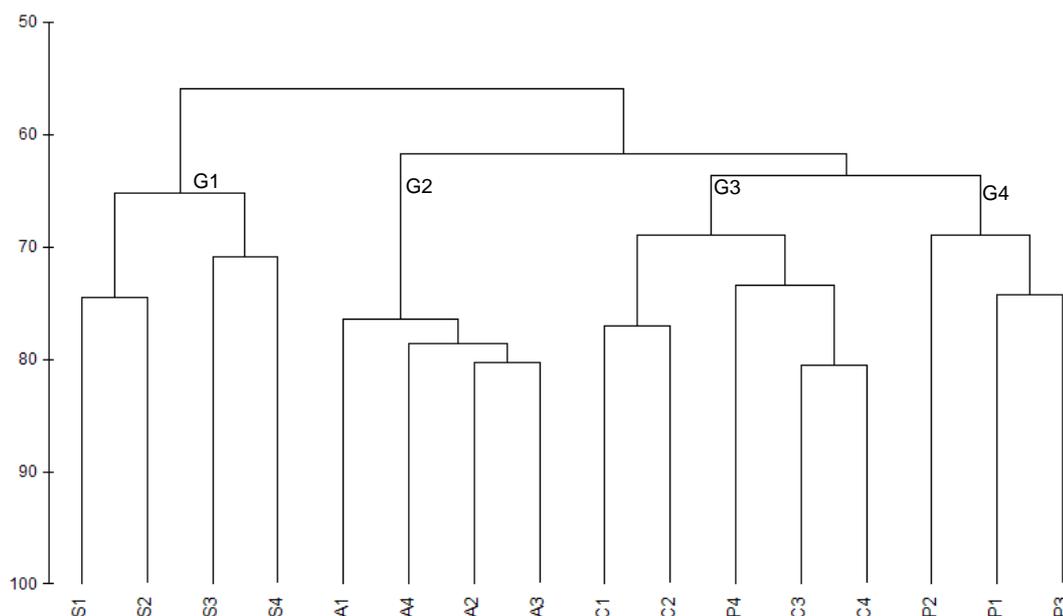


Figura 7: Dendrograma gerado através dos programas GelCompar e Primer (utilizando-se coeficiente de Person e método de análise cluster UPGMA) para analisar os perfis de bandas em experimento de amplificação do gene de 16S ribossomal e PCR-DGGE das amostras de solo. Legenda das canaletas: A₁ – Amostra 1 do plantio de acácia; A₂ – Amostra 2 do plantio de acácia; A₃ – Amostra 3 do plantio de acácia; A₄ – Amostra 4 do plantio de acácia; C₁– Amostra 1 da capoeira; C₂ – Amostra 2 da capoeira; C₃ – Amostra 3 da capoeira; C₄– Amostra 4 da capoeira; P₁ – Amostra 1 da pastagem; P₂ – Amostra 2 da pastagem; P₃ – Amostra 3 da pastagem; P₄– Amostra 4 da pastagem; S₁ – Amostra 1 do plantio de sabiá; S₂ – Amostra 2 do plantio de sabiá; S₃ – Amostra 3 do plantio de sabiá; S₄ – Amostra 4 do plantio de sabiá.

O dendrograma, apresentado na figura 8, foi obtido a partir das amostras de serapilheira. Observou-se, também, alta similaridade entre amostras de uma mesma área com aproximadamente 71, 55, 59 e 66% de similaridade para acácia, capoeira, pastagem e sabiá, respectivamente. Os perfis de bandas do DGGE se separaram a aproximadamente 33% de similaridade, mostrando a existência de três grupos. Os grupos G1 e G2 formados pelas áreas, capoeira e pastagem, respectivamente. O grupo G3, pelas leguminosas (acácia e sabiá) (Figura 8). É possível que a semelhança entre a acácia e o sabiá seja relacionada à introdução de espécies de bactérias não nativas do solo do ecossistema original, uma vez que as mudas de sabiá e acácia foram produzidas em áreas diferentes das da coleta.

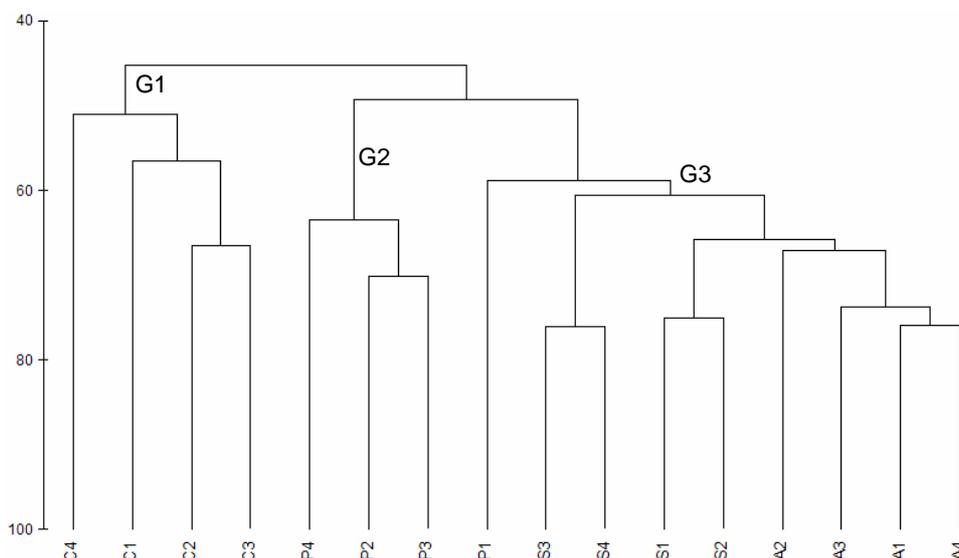


Figura 8: Dendrograma gerado através dos programas GelCompar e Primer (utilizando-se coeficiente de Person e método de análise cluster UPGMA) para analisar os perfis de bandas em experimento de amplificação do gene de 16S ribossomal e PCR-DGGE das amostras de serapilheira.

Legenda das caneletas: A₁ – Amostra 1 do plantio de acácia; A₂ – Amostra 2 do plantio de acácia; A₃ – Amostra 3 do plantio de acácia; A₄ – Amostra 4 do plantio de acácia; C₁– Amostra 1 da capoeira; C₂ – Amostra 2 da capoeira; C₃ – Amostra 3 da capoeira; C₄ – Amostra 4 da capoeira; P₁ – Amostra 1 da pastagem; P₂ – Amostra 2 da pastagem; P₃ – Amostra 3 da pastagem; P₄ – Amostra 4 da pastagem; S₁ – Amostra 1 do plantio de sabiá; S₂ – Amostra 2 do plantio de sabiá; S₃ – Amostra 3 do plantio de sabiá; S₄ – Amostra 4 do plantio de sabiá.

O Quadro 8 mostra a comparação, pelo método ANOSIM, da dissimilaridade entre as áreas, tendo este parâmetro sido estatisticamente diferente tanto para amostras de solo como de serapilheira, sugerindo influência da estrutura da comunidade microbiana total pelo tipo de uso da terra. Muitos estudos já demonstraram a influência da espécie de planta sobre a comunidade microbiana associada a ela (Germida *et al.*, 1998; Kaiser *et al.*, 2001; Smalla *et al.*, 2001; Bertrand *et al.*, 2001; Garbeva *et al.*, 2004; Patra *et al.*, 2005). Além disso, as comunidades vegetais podem modificar as condições dos micro-ambientes ocupados pelos microrganismos que, por conseguinte, alteram as estruturas das diversas populações na comunidade (Drozdowicz, 1991; Siqueira *et al.*, 1994).

Quadro 8: Comparação dos perfis de bandas DGGE comunidade bacteriana total do solo e da serapilheira a partir das amostras coletadas em diferentes coberturas vegetais. % de dissimilaridade (ANOSIM).

	Solo			Serapilheira			
	capoeira	pastagem	Sabiá	capoeira	pastagem	sabiá	
Acácia	96*	81*	97*	acácia	83*	64*	47*
Capoeira		59*	98*	capoeira		89*	87*
Pastagem			88*	pastagem			80*

* significativo $p < 0,05$ NS não significativo

As regressões lineares negativas da estrutura da comunidade microbiana total do solo com os teores de carbono orgânico e nitrogênio total do solo, nitrogênio total da serapilheira e positivas com a relação C:N da serapilheira (Quadro 9) são modelos preditivos que explicam a influência direta da fertilidade do solo sobre as comunidades microbianas do solo. Assim, em solos com elevados teores de carbono e nitrogênio, como nas matas naturais, há seleção de estrategistas do tipo “k”, que é a seleção de espécies para as quais, atingir um tamanho estável e equilibrado, representa uma estratégia bem sucedida. Nos solos com baixo teor de nutrientes ou alto teor de substratos recalcitrantes (alta relação C:N da serapilheira), também ocorre a seleção do tipo “k”, indicativo de bactérias com baixo potencial de crescimento, mas com alta capacidade de competir por substratos.

Quadro 9: Equações de regressão linear simples entre os valores de estrutura da comunidade microbiana total e as características químicas do solo e da serapilheira. n=16

Regressões	R ²
16S solo = 0,760 Na solo + 19,449	0,29*
16S solo = 0,302 K solo + 34,064	0,27*
16S solo = - 5,101 N total solo + 59,287	0,20*
16S solo = - 0,580 C-org solo + 64,743	0,18*
16S solo = - 1,343 N total serapilheira + 62,732	0,32*
16S solo = 0,910 C:N serapilheira + 21,582	0,40**
16S serapilheira = 0,691 Na solo + 22,367	0,30*

** significativo a nível de 1% de probabilidade; * significativo a nível de 5% de probabilidade; 16S: comunidade microbiana total; Na: sódio; K: potássio; N total: nitrogênio total; C-org.: carbono orgânico; C:N: relação entre carbono orgânico e nitrogênio total

Já para a estrutura da comunidade microbiana total da serapilheira, o sódio é um dos fatores que explicam a dissimilaridade genética observada entre as diferentes coberturas vegetais (Quadro 9). Assim, no presente trabalho, acredita-se que, nos solos com alta disponibilidade de sódio (Na) e Potássio (K), há uma seleção de microrganismos estrategistas do tipo “r”, isto é, máximo crescimento populacional, produzindo vasto número de descendentes de uma só vez ou em curtos intervalos. Esta estratégia permite uma próxima geração para manter a espécie.

Outras variáveis, não avaliadas neste trabalho e que poderiam contribuir para esclarecer as diferenças das estruturas genéticas de comunidades microbianas, são a radiação solar e a umidade. Estes fatores ambientais são muitas vezes responsáveis pelas alterações genéticas, tais como as mutações e deleções. Além disso, a elevação de temperatura e a perda de umidade

proporcionam uma seleção de microrganismos do tipo “I”, que é a seleção de organismos adaptados (Panilov, 1999). Baseado nos estudos de Reiners *et al.* (1994), o desmatamento das matas nativas altera a vegetação e as propriedades do solo. Neste contexto, as comunidades microbianas do solo, além de sofrerem influências por diferenças na cobertura vegetal, também podem ser afetadas por modificações nas condições do meio (Colozzi Filho *et al.*, 1999; Bertrand *et al.*, 2001; Garbeva *et al.*, 2004).

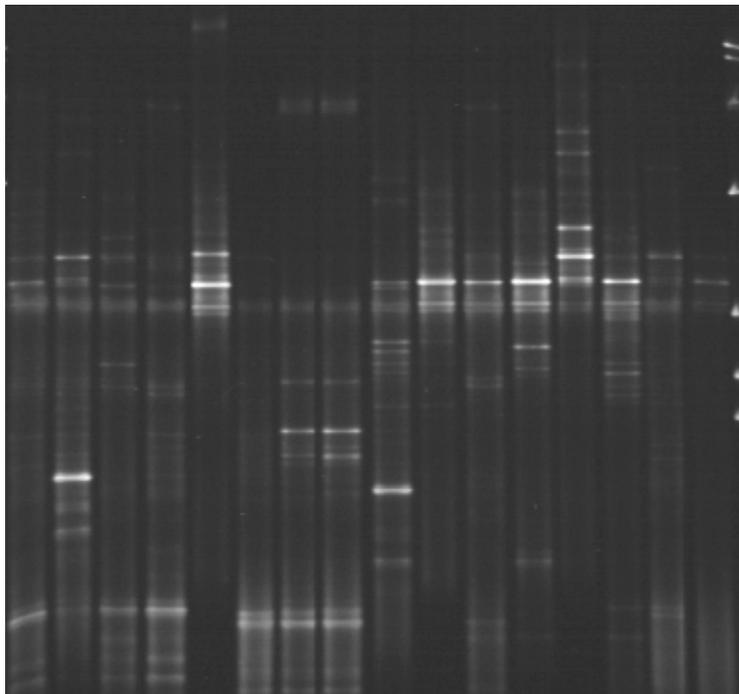
6.2.3.2. Diversidade genética e estrutura das comunidades nitrificadoras nos compartimentos solo e serapilheira

6.2.3.2.1. Análise visual dos géis

A figura 9 mostra as separações dos produtos de PCR gerados com a amplificação utilizando iniciadores para o gene *AOB* (“ammonia-oxidizing bacteria” = bactérias oxidadoras de amoníaco) das comunidades bacterianas nitrificadoras das amostras de solo e serapilheira avaliadas. Os géis obtidos apresentaram um perfil mais simples comparado ao do gene 16S DNAr, permitindo identificar visualmente padrões diferentes da comunidade bacteriana, com a existência de bandas específicas para determinadas áreas e de fácil identificação no gel, além da existência de bandas comuns a todos os tratamentos.

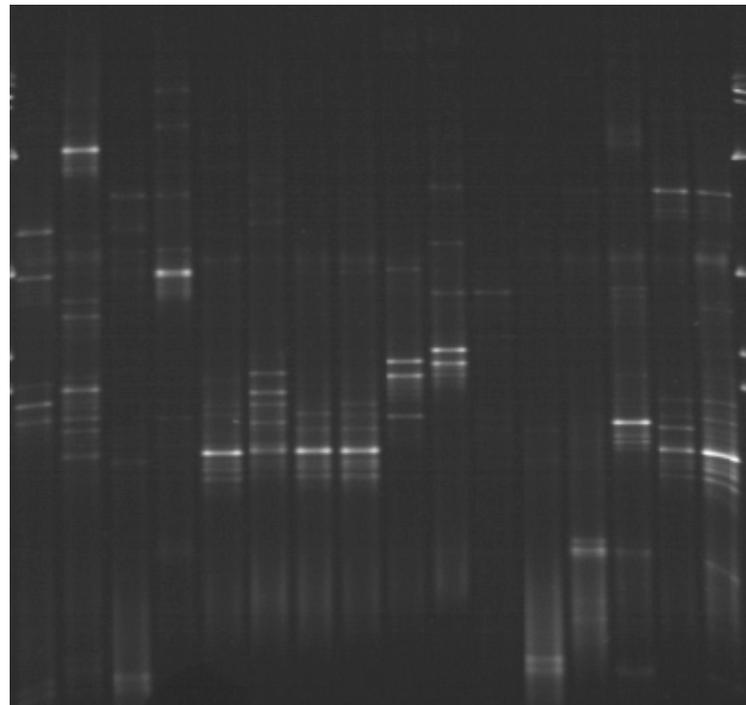
Dez bandas (ACPS) foram comuns entre as amostras de solos (Quadro 10) e quarenta e cinco bandas, entre as amostras de serapilheira (Quadro 11). Considerando a capoeira como referência, foi observada, para as amostras de solo, a ausência de três bandas na pastagem (ACS) e duas no sabiá (ACP) (Quadro 10). Enquanto nas amostras de serapilheira, notou-se a ausência de três bandas para acácia (CPS), quatro no sabiá (ACP) e cinco na pastagem (ACS) (Quadro 11). Outro ponto relevante é a presença de uma banda apenas na acácia, pastagem e sabiá (APS) para as amostras de solo (Quadro 10), e duas, para as amostras de serapilheira (Quadro 11). Verificou-se, para as amostras de solo, a existência de três bandas específicas para cada uma das áreas capoeira (C), sabiá (S), pastagem (P), e seis bandas, para à acácia (A) (Quadro 10), diferente do que foi observado para a comunidade bacteriana total. Estes resultados sugerem uma certa evolução, ou seja, houve transformação de populações das comunidades nitrificadoras ao longo do tempo, ou ainda, alterações na frequência dos genes dessas populações.

A1 A2 A3 A4 C1 C2 C3 C4 P1 P2 P3 P4 S1 S2 S3 S4



A – Estrutura genética das comunidades nitrificadoras do solo

A1 A2 A3 A4 C1 C2 C3 C4 P1 P2 P3 P4 S1 S2 S3 S4



B – Estrutura genética das comunidades nitrificadoras da serapilheira

Figura 9: Perfil de bandas obtido pela análise de DGGE dos fragmentos do gene AOB amplificado com o par de iniciadores CTO189f-GC e CTO654r e com os primers 357f-GC e 518r, comparando amostras de solo (A) e serapilheira (B) das quatro diferentes coberturas vegetais.

A1: amostra 1 da acácia; A2: amostra 2 da acácia; A3: amostra 3 da acácia; A4: amostra 4 da acácia; C1: amostra 1 da capoeira; C2: amostra 2 da capoeira; C3: amostra 3 da capoeira; C4: amostra 4 da capoeira; P1: amostra 1 da pastagem; P2: amostra 2 da pastagem; P3: amostra 3 da pastagem; P4: amostra 4 da pastagem; S1: amostra 1 da sabiá; S2: amostra 2 da sabiá; S3: amostra 3 da sabiá e S4: amostra 4 da sabiá.

Quadro 10: Padrão de bandas DGGE-AOB, comparando amostras de solo das diferentes coberturas vegetais.

	A1	A2	A3	A4	C1	C2	C3	C4	P1	P2	P3	P4	S1	S2	S3	S4
L1					C											
L2													S			
L3													S			
L4	ACP	ACP	ACP	ACP			ACP	ACP			ACP					
L5		A														
L6													S			
L7		AS											AS		AS	
L8									PS	PS				PS	PS	
L9									PS							
L10	ACPS		ACPS		ACPS				ACPS							
L11	ACPS		ACPS		ACPS					ACPS	ACPS	ACPS	ACPS			
L12	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS					ACPS	ACPS	ACPS	ACPS			
L13	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS				ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS		
L14	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS				ACPS						
L15	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS				ACPS							
L16	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS				ACPS							
L17					CP					CP	CP	CP				
L18	ACPS															
L19									PS	PS	PS	PS		PS		
L20									P							
L21			APS						APS			APS		APS		
L22									APS					APS		
L23	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS			APS		
L24	APS	APS	APS	APS							APS			APS		
L25		AP	AP	AP					AP	AP						
L26		A														
L27	AC	AC	AC	AC		AC	AC	AC								
L28	ACS		ACS	ACS			ACS	ACS							ACS	
L29		ACS					ACS	ACS	ACS						ACS	
L30				AC			AC									
L31	AP	AP									AP					
L32		ACS		ACS		ACS		ACS							ACS	
L33							CPS		CPS		CPS				CPS	
L34	AC	AC	AC	AC				AC								
L35						C	C									
L36		AS	AS												AS	
L37		A														
L38			AP	AP					AP	AP	AP	AP				
L39	A	A		A												
L40				A												
L41	A		A	A												
L42								C								
L43	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	
L44						CPS	CPS			CPS	CPS	CPS		CPS	CPS	
L45	AC	AC	AC	AC		AC	AC	AC								
L46	AC	AC	AC	AC		AC										
L47						CP	CP	CP			CP					
L48	ACP	ACP	ACP	ACP				ACP		ACP						
L49						CP	CP			CP	CP					

A: banda visualizada apenas na acácia; C: banda visualizada apenas na capoeira; P: banda visualizada apenas na pastagem; S: banda visualizada apenas no sabiá; AC: bandas visualizadas apenas na acácia e na capoeira; AP: bandas visualizadas apenas na acácia e na pastagem; PS: bandas visualizadas apenas na pastagem e no sabiá; AS: bandas visualizadas apenas na acácia e no sabiá; CP: bandas visualizadas apenas na capoeira e na pastagem; ACP: bandas visualizadas apenas na acácia, na capoeira e na pastagem; ACS: bandas visualizadas apenas na acácia, na capoeira e no sabiá; APS: bandas visualizadas apenas na acácia, na pastagem e no sabiá; CPS: bandas visualizadas apenas na capoeira, na pastagem e no sabiá; ACPS: bandas visualizadas em todas as coberturas.

Quadro 11: Padrão de bandas DGGE-AOB, comparando amostras de serapilheira das diferentes coberturas vegetais.

	A1	A2	A3	A4	C1	C2	C3	C4	P1	P2	P3	P4	S1	S2	S3	S4
L1		AP							AP	AP						
L2	ACPS	ACPS		ACPS				ACPS		ACPS	ACPS			ACPS		ACPS
L3	ACPS	ACPS						ACPS								
L4	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS				ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS
L5	ACPS	ACPS		ACPS		ACPS						ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	
L6	ACPS	ACPS					ACPS	ACPS				ACPS		ACPS	ACPS	
L7	ACS		ACS	ACS		ACS							ACS	ACS		ACS
L8	ACPS			ACPS	ACPS	ACPS				ACPS						ACPS
L9	ACPS	ACPS				ACPS					ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS
L10	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS			ACPS		ACPS	ACPS
L11	ACPS	ACPS		ACPS		ACPS				ACPS					ACPS	
L12	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS
L13	ACS		ACS	ACS	ACS	ACS							ACS	ACS	ACS	ACS
L14	ACPS				ACPS	ACPS										
L15	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	
L16		ACP	ACP		ACP	ACP	ACP	ACP	ACP							
L17			ACPS			ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS			ACPS	ACPS	ACPS
L18		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS			ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS
L19			ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS
L20					CPS		CPS		CPS				CPS	CPS		CPS
L21					CPS		CPS	CPS	CPS		CPS	CPS		CPS		CPS
L22			ACPS		ACPS											
L23	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS		ACPS									
L24									PS	PS		PS				PS
L25	AP		AP	AP					AP			AP				
L26	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS
L27	ACP		ACP	ACP			ACP	ACP	ACP	ACP	ACP	ACP				
L28	ACPS			ACPS			ACPS		ACPS					ACPS		
L29	APS	APS	APS	APS						APS	APS	APS	APS	APS	APS	
L30	APS	APS	APS									APS	APS	APS	APS	APS
L31	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS				ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS
L32		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS				ACPS		ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS
L33		AP	AP						AP	AP						
L34		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS			ACPS							
L35		ACPS	ACPS			ACPS			ACPS	ACPS	ACPS		ACPS			
L36		ACPS	ACPS	ACPS		ACPS		ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS		ACPS	ACPS
L37			ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS				ACPS	ACPS	ACPS
L38		ACPS						ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS		
L39	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS			ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS
L40		ACPS				ACPS			ACPS		ACPS			ACPS		ACPS
L41	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS		ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS
L42	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS			ACPS	ACPS	ACPS
L43	ACS	ACS	ACS	ACS		ACS								ACS		ACS
L44	ACPS	ACPS	ACPS			ACPS	ACPS	ACPS			ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS
L45	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS		ACPS		ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS
L46			ACS	ACS	ACS	ACS	ACS	ACS						ACS	ACS	ACS
L47		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS			ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS
L48	ACPS			ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS
L49	ACPS		ACPS			ACPS										
L50			ACPS	ACPS	ACPS			ACPS		ACPS			ACPS	ACPS		ACPS
L51	ACS		ACS	ACS	ACS									ACS	ACS	
L52			ACPS	ACPS	ACPS						ACPS			ACPS	ACPS	
L53	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS				ACPS		ACPS					ACPS
L54		ACPS		ACPS	ACPS				ACPS				ACPS		ACPS	ACPS
L55		ACPS		ACPS	ACPS				ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS

L56	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS		ACPS				ACPS
L57		AP	AP	AP					AP		AP		
L58	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS
L59	ACPS	ACPS		ACPS		ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS
L60			ACPS		ACPS		ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS
L61				CPS	CPS	CPS	CPS	CPS			CPS	CPS	CPS
L62	ACPS		ACPS	ACPS			ACPS						
L63		ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS		ACPS
L64		ACPS		ACPS	ACPS	ACPS				ACPS	ACPS	ACPS	
L65									PS	PS	PS	PS	
L66		ACP		ACP	ACP			ACP	ACP				
L67		ACP			ACP			ACP	ACP	ACP			

AP: bandas visualizadas apenas na acácia e na pastagem; PS: bandas visualizadas apenas na pastagem e no sabiá; PS: bandas visualizadas apenas na pastagem e no sabiá; ACP: bandas visualizadas apenas na acácia, na capoeira e na pastagem; ACS: bandas visualizadas apenas na acácia, na capoeira e no sabiá e uma no sabiá; APS: bandas visualizadas apenas na acácia, na pastagem e no sabiá; CPS: bandas visualizadas apenas na capoeira, na pastagem e no sabiá; ACPS: bandas visualizadas na acácia, na capoeira, na pastagem e no sabiá.

Os índices de diversidade (Shannon e Simpson) dos perfis de polimorfismos do gene *AOB*, obtidos a partir das amostras de solo e serapilheira, foram estatisticamente iguais entre as áreas avaliadas (Quadro 12), indicando padrões de adaptação a ambientes extremos similares das comunidades bacterianas nitrificadoras. Estes resultados mostram que as flutuações ambientais têm um grande papel na estrutura da comunidade bacteriana nitrificadora, enquanto o tipo de planta apresenta um papel muito menos significativo.

Quadro 12: Índices de diversidade dos perfis DGGE comunidades bacterianas nitrificadoras do solo e da serapilheira das diferentes coberturas estudadas de acordo com Shannon e com Simpson.

Sítios	Solos		Serapilheira	
	Índice de Shannon	Índice de Simpson	Índice de Shannon	Índice de Simpson
Acácia	2,3 a	0,85 a	2,8 a	0,88 a
Sabiá	1,7 a	0,75 a	2,4 a	0,82 a
Capoeira	2,0 a	0,84 a	2,3 a	0,78 a
Pastagem	2,0 a	0,80 a	2,7 a	0,87 a
CV %	16,74	9,48	14,70	8,51

Médias (de quatro repetições) seguidas de pelo menos uma mesma letra em cada coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan em nível de 5% de probabilidade. CV: coeficiente de variação.

Apesar da baixa diversidade genotípica existente, algumas bandas apresentaram-se específicas para uma determinada área, considerando a PCR-DGGE, reforçando a importância do uso de ferramentas moleculares na análise genotípica de comunidades bacterianas. A técnica de DGGE pode ser amplamente utilizada no estudo das mudanças ocorridas nas comunidades microbianas no ambiente natural ou submetido a condições de estresse, ou no monitoramento de microrganismos específicos em um ambiente natural, sendo esta uma poderosa ferramenta de estudo (Muyzer e Smalla, 1998; Bothe *et al.*, 2000; Kowalchuk *et al.*, 2000; Rosado e Duarte, 2002; Rowan *et al.*, 2003; Calvo *et al.*, 2004). Muyzer *et al.* (1993) já haviam demonstrado que metodologias de PCR-DGGE são extremamente simples, rápidas e eficazes para distinguir fragmentos de DNA que diferem em apenas um par de bases.

6.2.3.2.2. Dendrograma obtido a partir da análise dos perfis de bandas AOB-DGGE das comunidades nitrificadoras do solo e da serapilheira

O agrupamento das áreas com base no perfil do gel dos produtos PCR-*AOB* das amostras de solo coletadas está apresentado na figura 10. Entre as amostras

representantes de uma mesma área, obteve-se uma baixa similaridade da ordem de 51, 31, 54 e 47%, para acácia, capoeira, pastagem e sabiá, respectivamente. Ainda pela figura 10, observou-se a separação das áreas em dois grupos genotípicos com, aproximadamente, 21% de similaridade. O grupo G1 é formado pelas amostras coletadas nos solos sob pastagem e sabiá e o grupo G2, pelas amostras coletadas nos solos sob acácia e capoeira. Este resultado demonstra que o solo sob acácia possui a mesma estrutura genética que a capoeira considerada como referência, sugerindo uma sucessão microbiana, ou seja, pode-se inferir que esta cobertura vegetal retornou a população microbiana que estava presente antes da conversão da mata em pastagens.

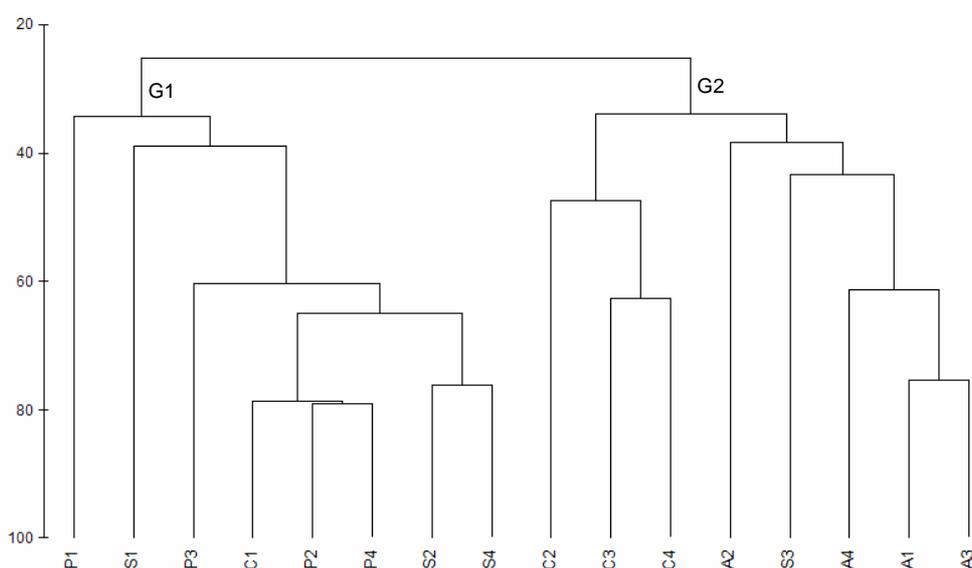


Figura 10: Dendrograma gerado através dos programas *GelCompar* e *Primer* (utilizando-se coeficiente de Person e método de análise cluster UPGMA) para analisar os perfis de bandas em experimento de amplificação do gene *AOB* e PCR-DGGE das amostras de solo.

Legenda das caneletas: A₁ – Amostra 1 do plantio de acácia; A₂ – Amostra 2 do plantio de acácia; A₃ – Amostra 3 do plantio de acácia; A₄ – Amostra 4 do plantio de acácia; C₁– Amostra 1 da capoeira; C₂ – Amostra 2 da capoeira; C₃ – Amostra 3 da capoeira; C₄ – Amostra 4 da capoeira; P₁ – Amostra 1 da pastagem; P₂ – Amostra 2 da pastagem; P₃ – Amostra 3 da pastagem; P₄ – Amostra 4 da pastagem; S₁ – Amostra 1 do plantio de sabiá; S₂ – Amostra 2 do plantio de sabiá; S₃ – Amostra 3 do plantio de sabiá; S₄ – Amostra 4 do plantio de sabiá.

O dendrograma de similaridade, construído com base no perfil do gel dos produtos PCR *AOB* das amostras de serapilheira (Figura 11), indicou uma baixa similaridade entre amostras da mesma área, a exceção das coletadas no solo sob capoeira. Estimou-se 26, 55, 27 e 28% de similaridade para acácia, capoeira,

pastagem e sabiá, respectivamente. Comparando os resultados dos perfis das diferentes áreas, observou-se um distanciamento genético entre as estruturas das comunidades microbianas, tornando impossível a formação de grupos. Valores de similaridade, menores do que 21%, foram observados quando se compara as áreas (Figura 11).

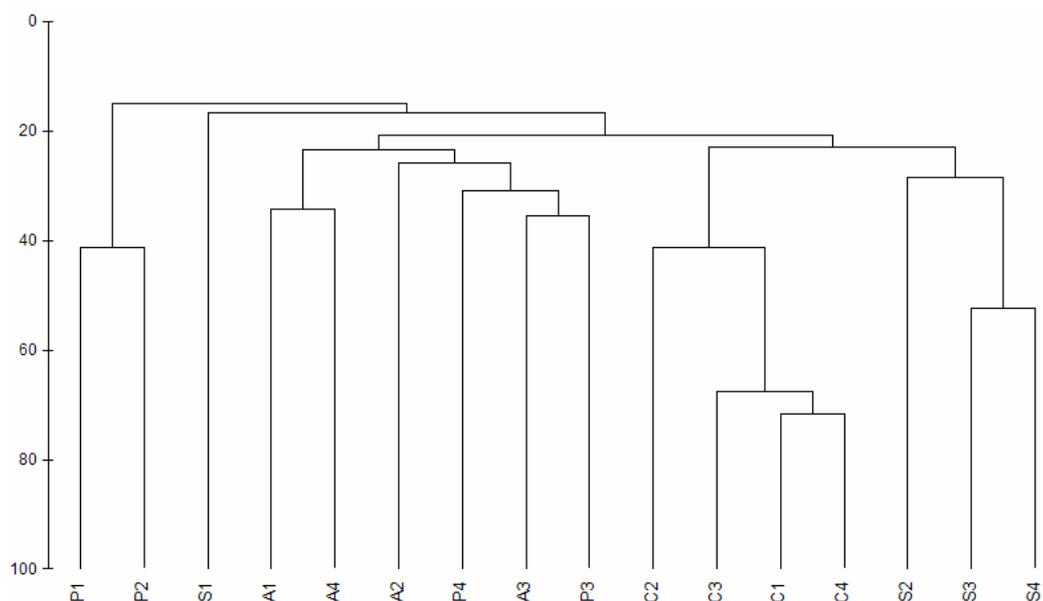


Figura 11: Dendrograma gerado através dos programas *GelCompar* e *Primer* (utilizando-se coeficiente de Person e método de análise cluster UPGMA) para analisar os perfis de bandas em experimento de amplificação do gene *AOB* e PCR-DGGE das amostras de serapilheira.

Legenda das canelitas: A₁ – Amostra 1 do plantio de acácia; A₂ – Amostra 2 do plantio de acácia; A₃ – Amostra 3 do plantio de acácia; A₄ – Amostra 4 do plantio de acácia; C₁– Amostra 1 da capoeira; C₂ – Amostra 2 da capoeira; C₃– Amostra 3 da capoeira; C₄– Amostra 4 da capoeira; P₁ – Amostra 1 da pastagem; P₂ – Amostra 2 da pastagem; P₃ – Amostra 3 da pastagem; P₄ – Amostra 4 da pastagem; S₁ – Amostra 1 do plantio de sabiá; S₂ – Amostra 2 do plantio de sabiá; S₃ – Amostra 3 do plantio de sabiá; S₄ – Amostra 4 do plantio de sabiá.

Estes resultados sugerem uma limitação dos iniciadores *CTO* quanto a sua utilização para o estudo de ecologia de bactérias nitrificadoras em amostras de serapilheira, ou seja, os iniciadores *CTO* (*CTO 189f-GC* e *CTO 654r*), utilizados neste presente trabalho, não produziram resultados com sensibilidade e especificidade suficientes para detectar as alterações das populações de bactérias nitrificadoras (Cebren *et al.*, 2004). Outra interpretação é que possíveis alterações tenham sido mascaradas pela forte variação entre as amostras de uma mesma área (Clegg *et al.*, 2000; McCaig *et al.*, 2001).

Em relação às amostras de solo, foram encontrados valores de dissimilaridades (ANOSIM) significativos entre a acácia e as áreas pastagem e sabiá (Quadro 13). Estes resultados demonstram, mais uma vez, a influência da estrutura

da comunidade microbiana nitrificadora pelo tipo de uso da terra, corroborando a evolução enunciada na análise visual dos géis.

Estresses naturais ou causados pelo homem podem causar mudanças na seqüência de DNA de espécies bacterianas (Allen, 1992). Tais alterações podem, ou não, equipar o organismo com meios melhores para sobreviver em seu ambiente. Se uma variante de gene melhora a adaptação para o ambiente, permitindo, por exemplo, fazer melhor uso de um nutriente disponível, a bactéria que leva aquele gene é mais provável de sobreviver e reproduzir que aqueles sem ele. Com o passar do tempo seus descendentes tenderão a aumentar e mudarão as características comuns da população. Vale ressaltar que a evolução, neste aspecto, é a adaptação de estruturas de diferentes organismos a uma condição ecológica, sendo que essas estruturas podem ter, ou não, a mesma função.

Quadro 13: Comparação dos perfis de bandas DGGE-AOB comunidades bacterianas nitrificadoras do solo e da serapilheira a partir das amostras coletadas em diferentes coberturas vegetais. % de dissimilaridade (ANOSIM).

	Solo			Serapilheira			
	capoeira	pastagem	Sabiá	Capoeira	pastagem	Sabiá	
Acácia	21 NS	71*	51*	acácia	73*	30 NS	48*
Capoeira		38 NS	34 NS	capoeira		84*	65*
Pastagem			17 NS	pastagem			65*

* significativo $p < 0,05$ NS não significativo

As alterações na estrutura das comunidades bacterianas nitrificadoras detectadas não refletiram os resultados de atividade potencial de nitrificação encontrados no trabalho¹, indicando um alto grau de redundância ecológica. A eliminação ou transformação de espécies de microrganismos sensíveis a um distúrbio qualquer favorece o aumento da população de outros microrganismos mais tolerantes ao distúrbio (Díaz-Raviña e Baath, 1996) e que desempenhariam a mesma “função” no sistema (Kennedy, 1999). É sabido, também, que a perda de elementos de um grupo funcional pode comprometer os processos por eles desempenhados (Zak *et al.*, 1994). Diante destes dados, outros estudos deveriam ser desenvolvidos para melhor elucidar as relações entre diversidade estrutural e funcional destas comunidades. Assim, será necessário o seqüenciamento das bandas específicas e compará-las com as seqüências depositadas nos Bancos de genes existentes na internet.

No Quadro 14, estão apresentadas as equações de regressão linear simples calculadas a partir dos valores de estrutura das comunidades microbianas nitrificadoras e as características químicas do solo e da serapilheira. Constatou-se

que o pH e a fertilidade do solo (Ca e SB) foram os fatores que mais contribuíram para o crescimento da comunidade nitrificadora da serapilheira coletada na acácia e no sabiá. Segundo Pereira (1999), as alterações no pH e na disponibilidade de nutrientes podem influenciar a comunidade microbiana de maneira direta através da atuação sobre processos microbianos, fisiológicos e bioquímicos específicos, ou, indiretamente, através da disponibilidade de nutrientes e da neutralização de elementos tóxicos. A sucessão microbiana observada no solo sob acácia pode estar relacionada à baixa acidez potencial e ao alto valor de pH. Já no solo sob capoeira, as alterações ocorridas nas comunidades nitrificadoras estariam relacionadas ao baixo valor de pH, à alta acidez potencial, ao elevado teor de alumínio do solo e ao alto teor de carbono na serapilheira colheitada nesta área. Estudos realizados por Del Moral e Müller (1970), em solos sob *Eucalyptus*, mostrou baixa ocorrência de bactérias associadas a um baixo valor de pH, ao elevado conteúdo de alumínio e à presença de compostos antimicrobianos, como o cineol, presentes nas folhas de eucalipto. Na pastagem, a seleção das bactérias nitrificadoras parece estar relacionada aos baixos teores de magnésio (Mg).

A comunidade de bactérias nitrificadoras mostrou-se afetada pela ação dos compostos fenólicos (Quadro 14), ao contrário da comunidade bacteriana total que não sofreu nenhum tipo de alteração decorrente dos teores de polifenóis totais encontrados neste trabalho. Estes resultados são bastantes condizentes com a literatura, onde os compostos fenólicos são muito citados devido à sua ação inibidora sobre o crescimento das bactérias nitrificadoras (Rice, 1984; Bremner e Mc Carty, 1993).

Quadro 14: Equações de regressão linear simples entre os valores de estrutura das comunidades microbianas nitrificadoras e as características químicas do solo e da serapilheira. n=16

Regressões	R ²
AOB solo = - 1,612 (H+Al) + 26,862	0,31*
AOB solo = -0,740 C-org serapilheira + 39,663	0,43*
AOB solo = - 4,494 Mg serapilheira + 20,856	0,31*
AOB solo = - 8,903 polifenóis + 22,371	0,31*
AOB serapilheira = 7,566 Ca solo + 30,441	0,59**
AOB serapilheira = 6,023 SB + 28,630	0,50**
AOB serapilheira = - 5,172 Al + 42,002	0,39**
AOB serapilheira = 10,350 pH solo - 7,838	0,42**
AOB serapilheira = - 1,792 (H+Al) + 49,746	0,39**
AOB serapilheira = - 0,630 C-org serapilheira + 59,973	0,33*

** significativo a nível de 1% de probabilidade; * significativo a nível de 5% de probabilidade; AOB: comunidade microbiana nitrificadora; H+Al: acidez potencial; C-org.: carbono orgânico; Mg: magnésio; Ca: cálcio; SB: soma de base; Al.: alumínio trocável.

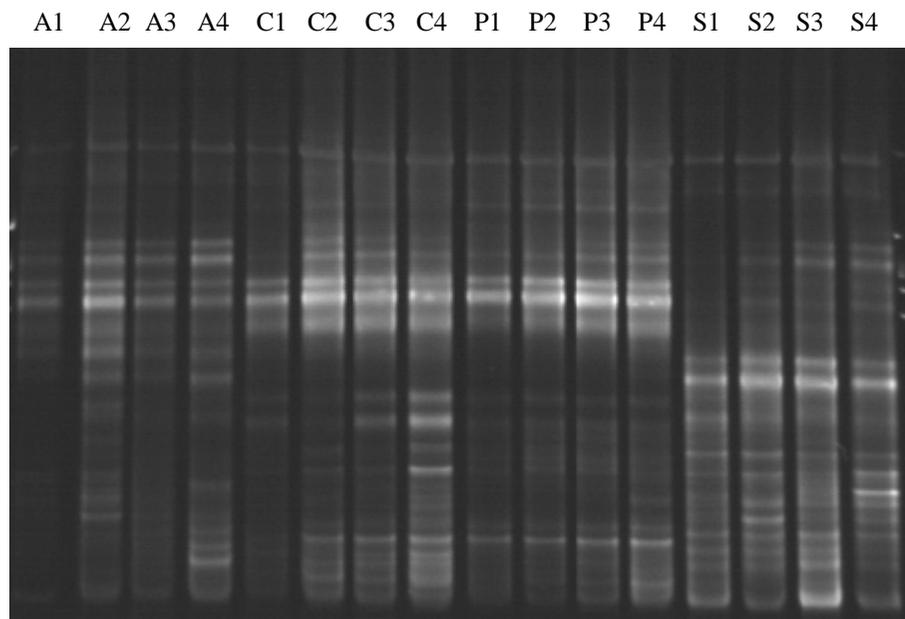
6.2.3.3. Diversidade genética e estrutura das comunidades desnitrificadoras nos compartimentos solo e da serapilheira

6.2.3.3.1. Análise visual do gel

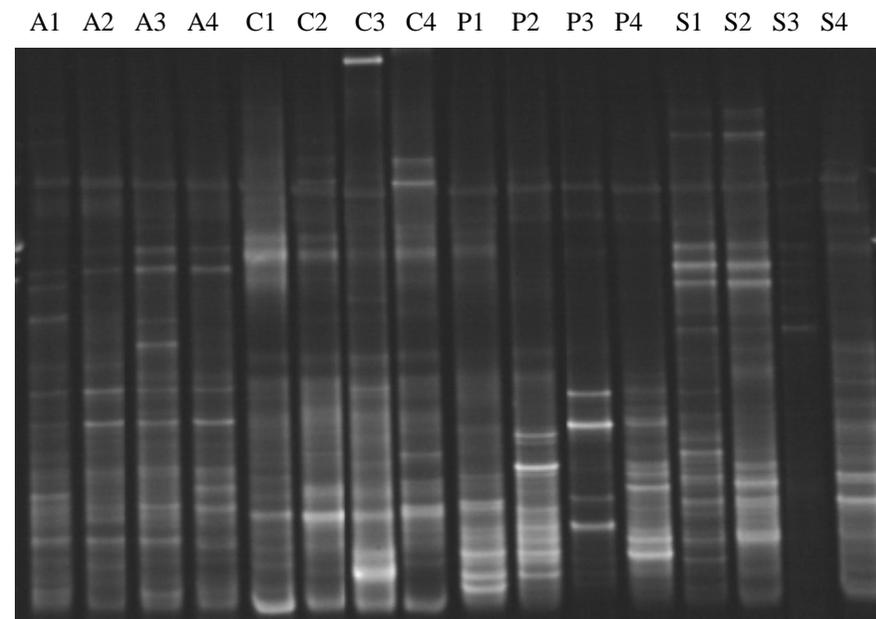
A estrutura das bactérias desnitrificadoras foi avaliada através da análise do perfil de bandas em experimento com amplificação do gene *NirK* e PCR-DGGE. Os géis obtidos apresentaram um perfil mais simples comparado ao do 16S DNAr (Figura 12), permitindo visualizar vinte e oito, e quarenta e duas bandas comuns para as amostras de solo e serapilheira, respectivamente (Quadros 15 e 16). Também foi observada a presença de três bandas apenas na acácia, pastagem e sabiá (APS) para as amostras de solo (Quadro 15), e uma banda, para as amostras de serapilheira (Quadro 16). Considerando a capoeira como referência, foi observada, para as amostras de solo, a ausência de sete bandas na sabiá (ACP) e oito bandas na acácia (CPS) e na pastagem (ACS) (Quadro 15). Já com o perfil de bandas obtidas pela análise das amostras de serapilheira, notou-se a ausência de três bandas na acácia (CPS), dez na pastagem (ACS) e duas na sabiá (ACP) (Quadro 16). Estes resultados, mais uma vez, demonstraram uma alta homologia entre as populações microbianas das diferentes áreas avaliadas.

Os índices de diversidade (Shannon e Simpson) dos perfis DGGE comunidades bacterianas desnitrificadoras do solo não apresentaram diferenças significativas entre as áreas pelo teste de Duncan, em nível de 5% de probabilidade, sugerindo um possível efeito das condições climáticas sobre a estrutura destas comunidades, mais significativo do que a influência provocada pelo tipo de cobertura vegetal (Quadro 17). Esses resultados são corroborados pela ausência de correlação significativa entre a estrutura da comunidade desnitrificadora do solo e as características químicas do solo e da serapilheira. Como as amostras foram coletadas em setembro, quando as temperaturas do solo estavam amenas e o conteúdo de água no solo mais elevado, pode ter ocorrido um estímulo para o desenvolvimento preferencial das populações de bactérias desnitrificadoras. Isto justificaria a alta semelhança entre as áreas, uma vez que as bandas analisadas representam apenas as espécies mais abundantes na amostra (Vetriani *et al.*, 1999).

As amostras de serapilheira revelaram maiores índices de diversidade, na acácia e no sabiá estatisticamente iguais entre si, e o menor índice, na pastagem; a capoeira apresentou os valores intermediários, não diferindo com a sabiá (Quadro 17). Estes resultados reforçam a hipótese de que o tipo de cobertura vegetal influencia mais a diversidade bacteriana do que o tipo de solo.



A – Estrutura genética da comunidade desnitrificadora do solo



B – Estrutura genética da comunidade desnitrificadora da serapilheira

Figura 12: Perfil de bandas obtido pela análise de DGGE dos fragmentos do gene NirK amplificados com primers 338f e 518r , comparando amostras de solo (A) e serapilheira (B) das quatro diferentes coberturas vegetais.

A1: amostra 1 da acácia; A2: amostra 2 da acácia; A3: amostra 3 da acácia; A4: amostra 4 da acácia; C1: amostra 1 da capoeira; C2: amostra 2 da capoeira; C3: amostra 3 da capoeira; C4: amostra 4 da capoeira; P1: amostra 1 da pastagem; P2: amostra 2 da pastagem; P3: amostra 3 da pastagem; P4: amostra 4 da pastagem; S1: amostra 1 da sabiá; S2: amostra 2 da sabiá; S3: amostra 3 da sabiá e S4: amostra 4 da sabiá.

Quadro 15: Padrão de bandas DGGE-NirK, comparando amostras de solo das diferentes coberturas vegetais.

	A1	A2	A3	A4	C1	C2	C3	C4	P1	P2	P3	P4	S1	S2	S3	S4
L1							CPS			CPS						
L2		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS						ACPS	ACPS	ACPS	ACPS
L3	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS				ACPS	ACPS			ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS
L4	ACPS			ACPS												
L5	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS			ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS
L6	ACPS				ACPS		ACPS									
L7	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS		ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS
L8	ACPS	ACPS	ACPS					ACPS	ACPS	ACPS	ACPS					ACPS
L9	ACPS			ACPS												
L10					CPS					CPS	CPS	CPS				CPS
L11			ACPS	ACPS		ACPS		ACPS	ACPS							
L12						CPS										
L13	AC	AC	AC	AC	AC											
L14	ACPS															
L15									PS				PS	PS		PS
L16	ACPS															
L17	ACPS															
L18									PS	PS			PS			
L19	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS				ACPS	ACPS	ACPS		ACPS
L20	AS	AS	AS	AS										AS	AS	
L21					CS	CS	CS	CS					CS			CS
L22	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS				ACPS								
L23	AP								AP			AP				
L24		APS	APS	APS					APS			APS	APS	APS	APS	APS
L25					CPS											
L26		AP							AP							
L27		APS	APS	APS					APS				APS	APS	APS	APS
L28					CPS		CPS									
L29		APS		APS					APS	APS	APS	APS	APS		APS	
L30					CPS	CPS		CPS								
L31			ACP	ACP	ACP				ACP	ACP	ACP	ACP				
L32					CPS											
L33	ACPS	ACPS		ACPS				ACPS	ACPS				ACPS			
L34	ACPS			ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS
L35	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS			ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS
L36		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS				ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS
L37			ACPS			ACPS										
L38		ACP														
L39	ACPS		ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS							
L40		ACPS														
L41		ACP	ACP		ACP				ACP	ACP	ACP	ACP				
L42						CPS										
L43																
L44	ACPS															
L45			AS										AS			
L46			ACPS				ACPS				ACPS			ACPS	ACPS	

L46		ACPS			ACPS			ACPS			ACPS ACPS	
L47		ACPS			ACPS			ACPS ACPS				ACPS
L48												
L49		ACPS	ACPS	ACPS			ACPS		ACPS		ACPS ACPS	
L50	ACS	ACS	ACS	ACS						ACS		
L51	ACS	ACS		ACS						ACS		
L52		ACS		ACS	ACS					ACS		
L53		ACPS	ACPS		ACPS			ACPS ACPS		ACPS	ACPS	
L54		ACP	ACP	ACP	ACP					ACP	ACP	
L55		AC		AC								
L56		AC	AC		AC	AC	AC					
L57				CS								CS
L58				CPS				CPS	CPS			CPS
L59		ACS			ACS			ACS				ACS
L60		AC	AC	AC								
L61		AS	AS									AS
L62			ACPS	ACPS		ACPS	ACPS		ACPS ACPS			ACPS
L63		ACS		ACS		ACS	ACS			ACS		ACS
L64		ACS		ACS	ACS	ACS	ACS					ACS
L65			ACS			ACS	ACS			ACS		ACS
L66				CS		CS	CS					CS
L67			ACP	ACP		ACP				ACP		
L68		ACP		ACP		ACP			ACP			
L69				CP						CP		
L70					CP							
L71		ACP			ACP					ACP		
L72		AS	AS	AS							AS	AS
L73			ACPS	ACPS	ACPS	ACPS			ACPS		ACPS	ACPS
L74		ACS	ACS	ACS	ACS							ACS

AC: bandas visualizadas apenas na acácia e na capoeira; AP: bandas visualizadas apenas na acácia e na pastagem; AS: bandas visualizadas apenas na acácia e no sabiá; CS: bandas visualizadas apenas na capoeira e no sabiá; CP: bandas visualizadas apenas na capoeira e na pastagem; PS: bandas visualizadas apenas na pastagem e no sabiá; PS: bandas visualizadas apenas na pastagem e no sabiá; ACS: bandas visualizadas apenas na acácia, na capoeira e no sabiá e uma no sabiá; APS: bandas visualizadas apenas na acácia, na pastagem e no sabiá; CPS: bandas visualizadas apenas na capoeira, na pastagem e no sabiá; ACPS: bandas visualizadas na acácia, na capoeira, na pastagem e no sabiá.

Quadro 16: Padrão de bandas NirK, comparando amostras de serapilheira das diferentes coberturas vegetais.

	A1	A2	A3	A4	C1	C2	C3	C4	P1	P2	P3	P4	S1	S2	S3	S4
L1				ACPS	ACPS	ACPS			ACPS	ACPS			ACPS		ACPS	
L2				ACPS	ACPS	ACPS			ACPS	ACPS			ACPS	ACPS	ACPS	
L3	ACS			ACS	ACS	ACS							ACS		ACS	
L4	ACS	ACS	ACS	ACS		ACS	ACS						ACS		ACS	
L5	AC			AC		AC	AC									
L6							CS	CS					CS			
L7							CPS	CPS	CPS						CPS	
L8		ACS		ACS	ACS		ACS	ACS					ACS			
L9	ACPS			ACPS			ACPS	ACPS	ACPS				ACPS			
L10				ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS			ACPS	ACPS		ACPS
L11	ACPS			ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS				ACPS	ACPS		ACPS
L12				ACPS				ACPS		ACPS	ACPS		ACPS	ACPS		ACPS
L13	ACS			ACS		ACS		ACS								ACS
L14				ACPS												
L15				ACPS				ACPS		ACPS						
L16	ACPS			ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS							
L17					CPS	CPS	CPS	CPS	CPS			CPS				CPS
L18	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS			ACPS		ACPS		ACPS		ACPS		
L19	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS		ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS
L20		ACPS	ACPS			ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS		ACPS	
L21	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS		ACPS		ACPS	ACPS
L22	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS								
L23	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS			ACPS		ACPS			ACPS	ACPS	ACPS	ACPS
L24	ACPS	ACPS	ACPS			ACPS		ACPS	ACPS	ACPS			ACPS	ACPS	ACPS	
L25	ACP	ACP	ACP	ACP			ACP		ACP							
L26	ACS	ACS	ACS	ACS		ACS	ACS	ACS					ACS	ACS	ACS	
L27		ACPS	ACPS	ACPS		ACPS			ACPS		ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS
L28	ACPS	ACPS			ACPS		ACPS		ACPS							
L29	APS	APS	APS	APS								APS	APS		APS	
L30	ACPS		ACPS		ACPS											
L31	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS			ACPS
L32	AC	AC	AC	AC		AC	AC									
L33		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS			ACPS	ACPS		ACPS		ACPS
L34		ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS								
L35	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS		ACPS						
L36	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS		ACPS	ACPS	
L37			ACPS	ACPS	ACPS					ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS
L38	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS				ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS
L39	ACPS															
L40	ACPS		ACPS													
L41	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS				ACPS		ACPS						
L42	ACPS		ACPS		ACPS											
L43	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS				ACPS							
L44	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS										
L45	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS				ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		
L46					CPS		CPS									
L47	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS						ACPS	ACPS	ACPS		ACPS

L47	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS		ACPS
L48	ACS	ACS	ACS	ACS	ACS	ACS					ACS	ACS
L49	ACPS	ACPS	ACPS				ACPS				ACPS	
L50	ACS	ACS	ACS	ACS					ACS		ACS	
L51	ACS		ACS	ACS					ACS		ACS	
L52	ACS				ACS				ACS		ACS	
L53	ACPS	ACPS	ACPS	ACPS			ACPS				ACPS	
L54	ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	ACPS	ACPS	ACPS			ACPS	
L55	ACP	ACP	ACP		ACP		ACP	ACP				
L56	ACPS		ACPS				ACPS	ACPS	ACPS		ACPS	
L57	ACPS	ACPS		ACPS			ACPS	ACPS				ACPS
L58		AS	AS									AS
L59	AS	AS										AS
L60	ACPS	ACPS		ACPS			ACPS				ACPS	
L61	ACS	ACS		ACS	ACS	ACS			ACS		ACS	ACS
L62		ACPS	ACPS	ACPS					ACPS	ACPS	ACPS	ACPS
L63	ACPS	ACPS			ACPS	ACPS	ACPS					ACPS
L64		ACS			ACS	ACS			ACS		ACS	ACS
L65					CS						CS	CS
L66									A	A	A	A
L67									A			A
L68									A			

AC: bandas visualizadas apenas na acácia e na capoeira; AS: bandas visualizadas apenas na acácia e no sabiá; CS: bandas visualizadas apenas na capoeira e no sabiá; CS: bandas visualizadas apenas na capoeira e no sabiá; ACP: bandas visualizadas apenas na acácia, na capoeira e na pastagem; ACS: bandas visualizadas apenas na acácia, na capoeira e no sabiá e uma no sabiá; APS: bandas visualizadas apenas na acácia, na pastagem e no sabiá; CPS: bandas visualizadas apenas na capoeira, na pastagem e no sabiá; ACPS: bandas visualizadas na acácia, na capoeira, na pastagem e no sabiá.

Quadro 17: Índices de diversidade dos perfis DGGE-NirK comunidades bacterianas desnitrificadoras do solo e da serapilheira das diferentes coberturas estudadas de acordo com Shannon e com Simpson.

Sitios	Solos		Serapilheira	
	Índice de Shannon	Índice de Simpson	Índice de Shannon	Índice de Simpson
Acácia	2,7 a	0,90 a	3,3 a	0,96 a
Sabiá	2,8 a	0,91 a	3,0 ab	0,93 ab
Capoeira	2,5 a	0,88 a	2,7 b	0,91 b
Pastagem	2,5 a	0,86 a	2,4 c	0,88 c
CV %	6,77	3,62	7,07	2,52

Médias (de quatro repetições) seguidas de pelo menos uma mesma letra em cada coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan em nível de 5% de probabilidade.

CV: coeficiente de variação.

6.2.3.3.2. Dendrograma obtido a partir da análise dos perfis de bandas NirK-DGGE das comunidades desnitrificadoras do solo e da serapilheira

O dendrograma, obtido a partir da matriz de similaridade baseada no perfil do gel dos produtos amplificados com os iniciadores *NirK* de amostras de solos (figura 13), mostrou uma alta similaridade entre as amostras coletadas numa mesma área, com 62, 68, 67 e 69% de similaridade para acácia, capoeira, pastagem e sabiá, respectivamente. A análise de agrupamento das diferentes áreas revelou a formação de três grupos principais, com aproximadamente 46% de similaridade. O primeiro grupo (G1) representa as amostras coletadas no sabiá, o segundo grupo (G2), as amostras da acácia e o terceiro grupo (G3), as amostras das demais coberturas (Figura 13), mostrando a importância da cobertura vegetal na manutenção e sobrevivência das comunidades desnitrificadoras. Segundo Wallenstein *et al.* (2006), a estrutura das comunidades desnitrificadoras do solo é fortemente influenciada pela umidade e temperatura. Solos descobertos são sujeitos a flutuações térmicas e hídricas que podem ocasionar alterações nas estruturas genéticas ou morte de parte da comunidade de microrganismos. Assim, a serapilheira depositada e acumulada sobre o solo diminui os efeitos de variação de temperatura e umidade, tornando o ambiente propício para o desenvolvimento das bactérias e outros organismos (Silva Filho e Vidor, 1984). Catelan e Vidor (1990), estudando os efeitos dos fatores ambientais sobre a população microbiana em solo sob diferentes sistemas de culturas, concluíram que o desenvolvimento dos microrganismos foi influenciado pela variação dos fatores climáticos como umidade e temperatura. Bossio e Scow (1998) ao estudarem a comunidade microbiana do solo em vários sistemas de manejo, verificaram que a população de microrganismos presentes no sistema que incluía pastagens foi menor do que outros sistemas estudados, indicando a forte influência do tipo de cobertura vegetal sobre os organismos microbianos. Em outro estudo similar, foi constatada maior presença de bactérias em solo cultivado com leguminosas do que em gramíneas (Wollum, 1982).

Adicionalmente, os diferentes tipos de serapilheira pela sua estrutura, espessura, qualidade, composição química e decomposição, entre outros aspectos, podem criar diferentes microhabitats; e diferentes espécies de microrganismos podem apresentar respostas positivas ou negativas em relação a eles. Curiosamente, a análise de dissimilaridade (ANOSIM) revelou valores

de dissimilaridade não significativa entre a capoeira e a pastagem (Quadro 18). Para este resultado, pode-se especular que as bactérias selecionadas nestas coberturas estejam relacionadas à qualidade da serapilheira, uma vez que, de modo geral, as serapilheiras de pior qualidade (alta concentração de polifenóis totais e relações C:N e lignina/(lignina+celulose) foram encontradas nessas áreas. Porém, outros estudos deveriam ser desenvolvidos para identificar as bactérias selecionadas e elucidar essa similaridade entre as áreas.

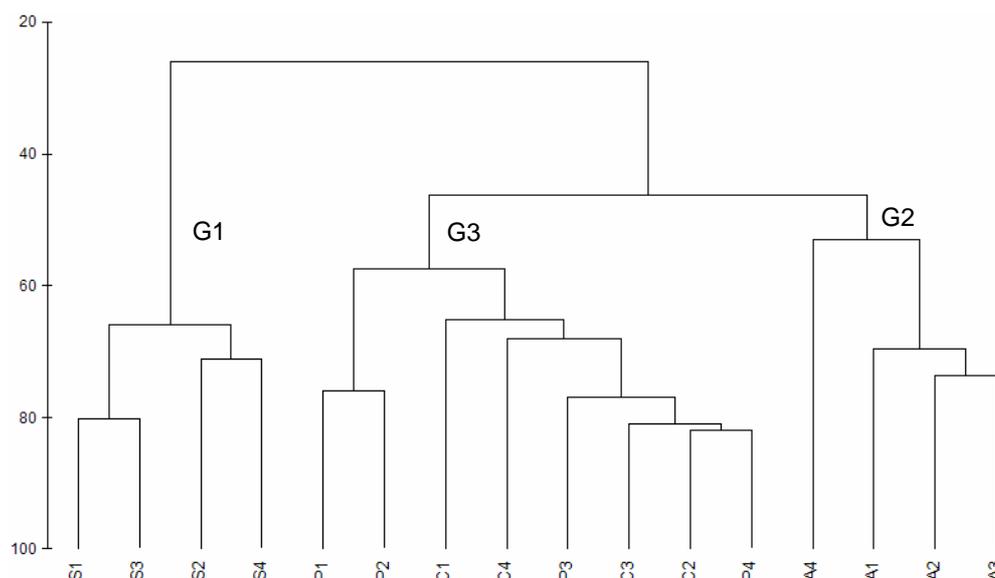


Figura 13: Dendrograma gerado através dos programas *GelCompar* e *Primer* (utilizando-se coeficiente de Person e método de análise cluster UPGMA) para analisar os perfis de bandas em experimento de amplificação do gene *NirK* e PCR-DGGE das amostras de solo. Legenda das canetas: A₁ – Amostra 1 do plantio de acácia; A₂ – Amostra 2 do plantio de acácia; A₃ – Amostra 3 do plantio de acácia; A₄ – Amostra 4 do plantio de acácia; C₁ – Amostra 1 da capoeira; C₂ – Amostra 2 da capoeira; C₃ – Amostra 3 da capoeira; C₄ – Amostra 4 da capoeira; P₁ – Amostra 1 da pastagem; P₂ – Amostra 2 da pastagem; P₃ – Amostra 3 da pastagem; P₄ – Amostra 4 da pastagem; S₁ – Amostra 1 do plantio de sabiá; S₂ – Amostra 2 do plantio de sabiá; S₃ – Amostra 3 do plantio de sabiá; S₄ – Amostra 4 do plantio de sabiá.

Quadro 18: Comparação dos perfis de bandas DGGE-NirK comunidades bacterianas desnitrificadoras do solo e da serapilheira a partir das amostras coletadas em diferentes coberturas vegetais. % de dissimilaridade (ANOSIM).

	Solo			Serapilheira		
	capoeira	pastagem	Sabiá	Capoeira	pastagem	sabiá
Acácia	91*	81*	99*	Acácia	75*	58*
Capoeira		24 NS	99*	Capoeira		21 NS
Pastagem			99*	Pastagem		38*

* significativo p < 0,05 NS não significativo

No presente trabalho, não foi encontrada uma correlação entre a atividade e a estrutura da comunidade bacteriana desnitrificadora. Este resultado demonstra que pode ocorrer a manutenção das funções bioquímicas

no ecossistema, mesmo quando ocorre a transformação gênica ou substituição de um determinado organismo por outro (Walker, 1992; Zilli *et al.*, 2003). Isso ocorre porque organismos funcionalmente semelhantes exibem várias formas de sobrevivência, adaptando-se a diferentes condições de crescimento e suportando adversidade de diferentes ambientes, habitats e nichos (Perry, 1989). Boyle *et al.* (2006), utilizando os iniciadores *NirK* para comparar solos sob floresta de Oregon, USA, também não encontraram correlação entre a atividade e a composição de comunidade desnitrificadora.

O resultado obtido a partir das amostras de serapilheira forneceu o dendrograma apresentado na (figura 14). Observa-se uma baixa similaridade entre as amostras coletadas numa mesma área (44, 43, 40% para capoeira, pastagem e sabiá, respectivamente), à exceção da acácia que apresentou similaridade alta de 61% entre as amostras (Quadro 16). As diferentes áreas não se agruparam devido, provavelmente, à baixa similaridade entre elas (21% aproximadamente) e à alta variabilidade das amostras coletadas numa mesma área (Clegg *et al.*, 2000; McCaig *et al.*, 2001) (Figura 14). Este resultado indica uma baixa eficiência dos iniciadores *Nirk* quanto a detecção das alterações na estrutura de comunidade bacteriana da serapilheira. Entretanto, foi possível detectar alguns efeitos do tipo de planta sobre as comunidades bacterianas desnitrificadoras.

A análise de proximidade (ANOSIM) revelou dissimilaridades estatisticamente significativas entre as diferentes áreas, exceto a capoeira e a pastagem, estatisticamente similares entre si (Quadro 18). Estes dados são corroborados pela regressão linear negativa entre a estrutura das comunidades bacterianas desnitrificadoras da serapilheira com a relação C:N e as regressões lineares positivas entre a estrutura das comunidades bacterianas desnitrificadoras da serapilheira com os valores de cálcio (Ca), celulose e relação celulose/N total da serapilheira (Quadro 19).

Nas serapilheira da acácia e do sabiá, consideradas de qualidade intermediária, é provável que os grupos de bactérias selecionadas sejam aquelas capazes de usar a celulose como fonte de carbono. Já nas estruturas de serapilheiras, coletadas na capoeira e na pastagem, supostamente, ocorreram os grupos mais adaptados aos compostos recalcitrantes. A comunidade microbiana é regulada pela qualidade da serapilheira, sendo extremamente dependente da relação C:N dos compostos orgânicos e da

6.2.4. CONCLUSÕES

A qualidade orgânica e nutricional da serapilheira influenciou a estrutura das comunidades bacterianas nitrificadoras do solo e desnitrificadoras da serapilheira.

A diversidade da população microbiana total foi maior na acácia e no sabiá quando comparados com a capoeira, sugerindo uma alteração da estrutura genética das bactérias presentes nestes solos pelo tipo de uso da terra.

A comunidade bacteriana nitrificadora da acácia possui a mesma estrutura genética que a da capoeira, considerada como referência, validando o uso desta leguminosa como estratégia de recuperação de áreas sob impacto antrópico.

Os iniciadores, *CTO* e *Nirk*, não produziram resultados com sensibilidade e especificidade suficientes para detectar as alterações das populações de bactérias nitrificadoras e desnitrificadoras da serapilheira.

6.2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen, M.F. (1992) *Mycorrhizal Functioning: An Integrative Plant-Fungal Process*. New York: Chapman & Hall, 515p.
- Bertrand, H., Nalin, R., Balli, R., Cleyet-Marel, J.C. (2001) Isolation and identification of the most efficient plant growth promoting bacteria associated with canola (*Brassica napus*). *Biology and fertility soils*, 33, p.142-156.
- Borneman, J.; Triplett, E.W. (1997) Molecular Microbial Diversity in Soils from Eastern Amazonia: Evidence for Unusual Microorganisms and Microbial Population Associated with Deforestation. *Applied and Environmental Microbiology*, v.63, p.2647-2653.
- Bossio, D.A., Scow, K.M. (1998) Impacts of carbon and flooding on soil microbial communities: phospholipid fatty acid profiles and substrate utilization patterns. *Microb. Ecol.*, 35, p.265-278.
- Bothe, H., Jost, G., Schloter, M., Ward, B.B., Witzel, K. (2000) Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiol Rev.*, 24, p.673-690
- Boyle, S. A., Rich, J. J., Bottomley, P. J., Cromack, J. K., Myrold D. D. (2006). Reciprocal transfer effects on denitrifying community composition and activity at forest and meadow sites in the Cascade Mountains of Oregon. *Soil Biology and Biochemistry* 38, p.870-878.
- Bremer, J. M., Mc Carty, G. W. (1993) Inhibition of nitrification in soil by allelochemicals derived from plants and plant residues. *Soil Biochemistry*, 8:181-218.
- Calvo, L., Vila, X., Abella, C.A., Garcia-Gil, L.J. (2004) Use of the ammonia-oxidizing bacterial-specific phylogenetic probe Nso1225 as a primer for fingerprint analysis of ammonia-oxidizer communities. *Appl Microbiol Biotechnol*, 63, p.715-721.
- Carter, M. R. (1986) Microbial biomass and index for tillage-induced changes in soil biological properties. *Soil & Tillage Research*, Amsterdam, v. 7, n. 1, p. 29-40.
- Catelan, A. J.; Vidor, C. (1990) Sistemas de culturas e a população microbiana do solo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. Campinas, v. 14, n. 2, p. 125-133.
- Cebon, A., Coci, M., Garnier, J., Laanbroek, H. J. (2004) Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Ammonia-Oxidizing Bacteria Community Structure in the Lower Seine River: Impact of Paris Wasterwater Effluents. *Applied Environmental Microbiology*, p. 6726–6737.

- Clarke, K. R.; Warwick, R. M. (1994) Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation. *Natural Environmental Research Council*, UK, 144p.
- Clegg, C. D.; Ritz, K.; Griffiths, B.S. (2000) % G1C profiling and cross hybridization of microbial DNA reveals great variation in below-ground community structure in UK upland grasslands. *Applied Soil Ecology*, 14, p.125–134.
- Colozzi Filho, A.; Balota, E. L., Andrade, S. (1999) Microrganismos e processos biológicos nos sistema plantio direto. In: *SIQUEIRA, J. O. et al. ed. Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas. Lavras : SBCS/UFLA*, p.487-508.
- De Fede, K. L., Panaccione, D. G., Sextone, A. J. (2001) Characterization of dilution enrichment cultures obtained from size-fractionated soil bacteria by Biolog community-level physiological profiles and restriction analysis of 16S rDNA genes. *Soil Biol. Biochem.*, 33, p.1555-1562.
- Degans, B. P., Schipper, L. A., Sparling, G. P., Vojvodic-Vukovic, M. (2000) Decreases in organic C reserves in soils can reduce the catabolic diversity of soil microbial communities, *Soil Biology and Biochemistry*, 32, p.189-196.
- Del Moral, R., Müller, C.H. (1970) The allelopathic effects of *Eucalyptus calmadulensis*. *American Midland Naturalist*, v.83, n.1, p.160-200.
- Díaz-Raviña, M., Baath, E. (1996) Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, p.2970-2977.
- Doran, J. W.; Coleman, D. C.; Bezdicsek, D. F.; Stewart, B. A. (Eds.). (1994) *Defining soil quality for a sustainable environment*. Wisconsin: American Society of Agronomy.
- Drozdowicz, A.G. (1991) Microbiologia ambiental. In: Roitman, I.; Travassos, L.R.; Azevedo, J.L. (1991) *Tratado de microbiologia*. Rio de Janeiro: Manole, v.2, p.1-102.
- Freitag, T. E., Prosser, J. I. (2003) Community structure of ammonia-oxidizing bacteria within anoxic marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 69, p.1359-1371.
- Garbeva, P., van veen, J.A., van Elsas, J.D. (2004) Microbial diversity in soil: Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease supressiveness. *Annual Review of Phytopatology*, 42, p. 243-270.
- Germida, J.J., Siciliano, S.D., Freitas, J.R., Seib, A.M., (1998) Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus*) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiology Ecology*, 26, p.43-50.

- Grayson, S. J.; Griffith, G. S.; Mawdesley, J. L.; Campbell, C. D., Bardgett, R. D. (2001) Accounting of variability in soil microbial communities of temperate upland grassland ecosystem. *Soil Biol. Biochem.*, 33, p.533-551.
- Hu, S. J., Van Bruggen, A. H. C., Grunwald, N. J. (1999) Dynamics of bacterial populations in relation to C availability in a residue-amended soil. *Appl. Soil Ecol.*, 13, p.21-30.
- Johnson, M. J.; Lee, K. Y.; Scow, K. M. (2003) DNA fingerprint reveals links among agricultural crops, soil properties, and the composition of soil microbial communities. *Geoderma*, Amsterdam, v. 114, n. 3/4, p. 279-303.
- Kaiser, O., Puhler, A., Selbitschka, W., (2001) Phylogenetic analysis of microbial diversity in the rizoplane of oilseed rape (*Brassica napus* cv. Westar) employing cultivation-dependent and cultivation-independent approaches. *Microbial Ecology*, 42, p.136-149.
- Kennedy, A. C. (1999) Bacterial diversity in agroecosystems. *Agricult. Ecos. Environ.*, 74, p.65-76.
- Kowalchuk, G.A.; Stephen, J.R.; De Boer, W.; Prosser, J.I.; Embley, T.M.; Woldendorp, J.W. (1997). Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the Subdivision of the class *Proteobacteria* in coastal sand dunes by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S Ribosomal DNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, p.1489-1497.
- Kowalchuk, G.A., Stienstra, A.W., Heilig, G.H., Stephen, J.R., Woldendorp, J.W. (2000) Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacteria in soil of successional grasslands of the Drentsche A (The Netherlands). *FEMS Microbiol Ecol*, 31, p.207-215
- Lavelle, P. Ecological challenges for soil science. (2000) *Soil Science*, 165, p.73-86
- Liu, X.; Tiquia, S.M.; Holguin, G.; Wu, L.; Nold, S.C.; Devol, A.H.; Luo, K.; Palumbo, A.V.; Tiedje, J.M.; Zhou, J. (2003) Molecular Diversity of Denitrifying Genes in Continental Margin Sediments within the Oxygen-Deficient Zone off the Pacific Coast of Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, p.3549-3560.
- Magurran, A.E. (1988) *Ecological Diversity and its Measurement*. New Jersey: Princeton University Press. 179p.
- Marschner, P., Kandeler, E., Marschner, B. (2003) Structure and fonction of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biol. Bioch.*, 35, p.453-461.
- McCaig, A. E., L. A. Glover, and J. I. Prosser. (2001) Numerical analysis of grassland bacterial community structure under different land management regimes by using 16S ribosomal DNA sequence data and denaturing gradient gel electrophoresis banding patterns. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, p.4554–4559.

- Muyzer, G., Smalla, K. (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Mini review. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73, p.127-141.
- Muyzer, G., De Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59, p.695-700.
- Odum, E. P. (1988) Populações em comunidades. *In: Odum, E.P., Eds., Ecologia*. São Paulo: Guanabara, p. 258-272.
- Ovreas, L., Forney, L., Daae, F. L., Torvick, V. (1997) Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saellenanet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S r RNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: p.3367-3373.
- Panilov, N. S. (1999) Understanding and prediction of soil microbial community dynamics under global change. *Applied Soil Ecology*, Amsterdam, v. 11, n. 1, p. 161-176.
- Patra, A. K. ; Abbadie, L. ; Clays-Josserand, A. ; Degrange, V. ; Grayston, S. J. ; Loiseau, P. ; Louault, F.; Mahmood, S.; Nazaret, S.; Philippot, L.; Poly, F.; Prosser, J.I.; Richaume, A.; Le Roux, X. (2005) Effects of grazing on microbial functional groups involved in soil N dynamics. *Ecological Monographs*, 75(1), p.65-80.
- Pereira, J. C.; Neves, M. C. P.; Drozdowicz, A. (1999) Dinâmica das populações bacterianas em solos de cerrados. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.34, n5, p.801- 811.
- Perry, D. A.; Amaranthus, M. P.; Borchers, J. G.; Borchers, S. L.; Brainerd, R. E. (1989) Bootstrapping in ecosystems. *Bioscience*. 39, p.230-237.
- Reiners, W.A.; Bouwman, A.F.; Parson, W.F.J.; Keller, M. (1994) Tropical Rainforest Conversion to Pasture: Change in Vegetation and Soil Properties. *Ecology Applied*, v.4, p.363-377.
- Rice, E. L. (1984) *Allelopathy*. Academic Press, Inc New York
- Rogers, B.F.; Tate III. (2001) Temporal analysis of the soil microbial community along a toposequence in Pineland soils. *Soil Biology and Biochemistry*, v.33, n.10, p.1389-1401.
- Rosado, A. S. (2000) Diversidade e ecologia de microrganismos do solo. *In: Reunião Brasileira de Fertilidade e Nutrição de Plantas, 23; Reunião Brasileira Sobre Micorrizas, 7; Simposio Brasileiro de Microbiologia do Solo, 5; Reunião Brasileira de Biologia do Solo, 2, 2000, Santa Maria. Anais...* Santa Maria: UFSM, 2000. CD-ROM..

- Rosado, A.S., Duarte, G.F. (2002) Utilização de eletroforese em gel com gradientes de desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura para estudar a diversidade microbiana. *In: Genética e melhoramento de microrganismos. Mello, I.S. (ed). EdUSP, São Paulo, p.97-129.*
- Rowan, A.K., Snape, J.R., Fearnside, D., Barer, M.R., Curtis, T.P., Head, I.M. (2003) Composition and diversity of ammonia-oxidizing bacterial communities in wastewater treatment reactors of different design treating identical wastewater. *FEMS Microbiol Ecol*, 43, p.195-206
- Shannon, C. E., Weaver, W. (1949) The Mathematical Theory of Communication. *University Illinois Press, Urbana.*
- Sheffield, V. C.; Cox, D. R.; Lerman, L. S.; Myers, R. M. (1989) Attachment of a 40-base pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 86, p. 232-236.
- Silva Filho, G.N.; Vidor, C. (1984) As práticas de manejo de solo na população microbiana. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. v. 8, n. 5, p. 291-296.
- Simpson, E.H. (1949) Measurement of diversity. *Nature*, v.163, n.4148, p.688.
- Siqueira, J.O.; Moreira, F.M.S.; Grisi, B.M.; Hungria, M.; Araujo, R.S. (1994) Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. p.142. (Embrapa-CNPAC. Documentos, 45).
- Smalla, K., Wieland, G., Buchner, A., Zock, A., Parzy, J., Kaiser, S., Roskot, N., Heur, H., Berg, G. (2001) Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient electrophoresis: plantdependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, p.4742-4751.
- Smit, E.; Leeflang, P.; Gommans, S.; Van Den Broek, J.; Van, M. S.; Wernars, K. (2001) Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 67, n. 5, p. 2284-2291,
- Swift, M.J.; Anderson, J.M. (1993) *Biodiversity and ecosystem Function. In : Agricultural Systems*: New York, v.99 p.15-41.
- Tiedje, J. M.; Cho, J. C.; Murray, A.; Treves, D.; Xia, B.; Ahou, J. (2001) Soil teeming with life: new frontiers for soil science. In: Rees, R. M.; Ball, B. C.; Campbell, C. D.; Watson, C. A. (Org.). *Sustainable management of soil organic matter*. Wallingford: CAB International, p. 393-412
- Vetriani, C., Jannasch, H.W.; MacGregor, B.J., Stahl, D.A.; Reysenbach, A.H. (1999) Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic *Archeae* in deep-sea sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, v.65, p.4375-4384.

- Waksman, S.A. (1927) Principles of soil microbiology. *Baltimore: The Williams and Wilkins*, 897p.
- Walker, B. H. (1992) Biodiversity and ecological redundancy. *Conserv.Biol.* 6, p.18-23.
- Wallenstein, M.D.; Myrold, D.D.; Firestone, M.; Voytek, M. (2006) Environmental controls on denitrifying communities and denitrification rates: insights from molecular methods. *Ecological Applications*, 16(6), p.2143-2152.
- Wollum, A.G. (1982) Cultural methods for soil microorganisms. In: Page, A.L.; Miller, R.H., Keeney, D.R. ed. *Methods of soil analysis*. Soil Science Society of America, Madison, p.781-802.
- Zak, J. C.; Willig, M. R.; Moorhead, D. L.; Wildman, H. G. (1994) Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v. 26, n. 9, p.1101-1108.
- Zilli, E.J.R., Rumjanek, N.G., Ribeiro, G.C., Costa, L.H., Neves M.C.P. (2003) Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. *Cad de Ciência & Tec* 20: 391-411

7. CONCLUSÃO GERAL

Este trabalho possibilitou a aquisição de informações importantes relativas à diversidade funcional e às alterações genéticas das populações microbianas presentes em áreas do bioma Mata Atlântica, localizadas no norte do Estado do Rio de Janeiro. Os dois atributos avaliados (a atividade microbiológica e a estrutura das comunidades microbianas), apresentaram-se como bons indicadores biológicos, pois detectaram alterações decorrentes do tipo de uso da terra.

A disponibilidade do carbono orgânico foi um fator importante no controle dos processos de nitrificação e desnitrificação.

A qualidade nutricional e orgânica da serapilheira influenciou a atividade microbiológica e as estruturas genéticas das comunidades microbianas.

A análise de diversidade da comunidade microbiana total do solo demonstrou uma população de bactérias presentes nos solos sob plantio de leguminosas, que não estava presente na capoeira, refletindo uma alta atividade microbiana e, conseqüentemente, uma melhoria na fertilidade desses solos.

A acácia possui a mesma estrutura genética da comunidade bacteriana nitrificadora que a capoeira, considerada como referência, validando o uso desta leguminosa como estratégia de recuperação de áreas sob impacto antrópico. Mas, apesar desta cobertura ter proporcionado o retorno da população que estava presente antes do desmatamento, os microrganismos ali presentes não conseguiram alcançar o mesmo desempenho (atividade) que os encontrados na capoeira.

Os iniciadores, *CTO* e *Nirk*, não produziram resultados com sensibilidade e especificidade suficientes para detectar as alterações das populações de bactérias nitrificadoras e desnitrificadoras da serapilheira.

O nível atual de compreensão dos processos funcionais do componente biótico do solo e de sua significância ecológica ainda não permite a recomendação de bioindicadores. Estudos posteriores são necessários para melhor entender a relação entre a diversidade estrutural e funcional dos microrganismos. Um deles é o seqüenciamento das bandas características de cada cobertura vegetal e, ou solo, que permitirá a identificação dos grupos de bactérias.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aber, J.D.; Melillo, J. M. (1980) Litter decomposition: measuring relative contributions of organic matter and nitrogen to forest soils. *Canadian Journal of Botany*, 58, p.416-421.
- Akkermans, A.D.L.; van Elsas, J.D. & De Bruijn, F.J. (1995) *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
- Alcântara, R.M.C.M. de. (1995) *Propriedades químicas e bioquímicas e suas interações em solos sob vegetação de mata e campo adjacentes*. Lavras: UFLA, 1995. 84p. (Dissertação tese de Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas).
- Alexander, M. (1977) *Introduction to Soil Microbiology*. 2. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 467p.
- Alfaia, S.S. (1997) Mineralização do nitrogênio incorporado como material vegetal em três solos da Amazônia Central. *Rev. Bras. Ci. Solo*, Viçosa, v. 21, n. 3, p.387-392.
- Allen, M.F. (1992) *Mycorrhizal Functioning: An Integrative Plant-Fungal Process*. New York: Chapman & Hall, 515p.
- Alvarez V., V.H.; Novais, R. F.; Barros, N. F.; Cantarutti, R. B.; Lopes, A. S. (1999) Interpretação dos resultados das análises de solos. In: *Ribeiro, A. C.; Guimarães, P. T. G.; Alvarez V., V. H. (Ed.). Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais – 5. Aproximação*. Viçosa, MG: CFSEMG, p. 25-32.

- Anderson, J.P.E.; Domsch, K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 10, p.215-221.
- Anderson, J.M. e Spencer, T. (1991) Carbon, nutrient and water balances of tropical rain forest ecosystems subject to disturbance. MAB Digest 7, UNESCO, Paris, 95p.
- Anderson, T.H.; Domsch, K.H. (1993) The metabolic quotient for CO₂ (qCO₂) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 25 (3), p.393-395.
- Anderson, J. D., Ingram, J. S. I. (1996) *Tropical soil biology and fertility*. In: *A handbook of methods*. 2. ed. Wallingford, UK CAB International, 171p.
- Andrade, A.G., Costa, G.S., Faria, S.M. (2000) Deposição e decomposição da serapilheira em povoamentos de *Mimosa caesalpiniiifolia*, *Acacia mangium* e *Acacia holosericea* com quatro anos de idade em plantossolo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.24, n.6, p.777-785.
- Andren, O. and Lagerlof J. (1983) Soil fauna (microarthropods, enchytraeids, nematodes) in Swedish agricultural cropping systems. *Acta Agr. Scand.* 33: p.33-52.
- Aulakh, M.S.; Doran, J.W.; Mosier, A.R. (1992) Soil denitrification - significance, measurement, and effects of management. *Adv. Soil Sci.*, 18, p.1-57.
- Baird, C. (2002) Química Ambiental. Porto Alegre, *Bookman*, 622p.
- Balieiro, F.C.; Franco, A.A.; Pereira, M.G.; Campello, E.F.C.; Dias, L.E; Faria, S.M.; Alves, B.J.R. (2004) Dinâmica da serrapilheira e transferência de nitrogênio ao solo, em plantios de *pseudosamanea guachapele* e *Eucalyptus grandis* *Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 39, n.6, p. 597-601.
- Ball, A.S., Milne, E., Drake, B.G. (2000) Elevated atmospheric-carbon dioxide concentration increases soil respiration in a mid-successional lowland forest. *Soil Biology & Biochemistry*, 32, p.721-723.
- Bardgett, R. D., Wardle, D. A. (2003) Herbivore-mediated linkages between aboveground and belowground communities. *Ecology* 84, p.2258–2268.
- Barreto, A. C.; Fernandes, M. F. (2001) Cultivo de *Gliricidia sepium* e *Leucaena leucocephala* em alamedas visando a melhoria dos solos dos tabuleiros costeiros. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, DF, v. 36, n. 10, p. 1287-1293.
- Barros, N.F.de; Comerford, N.B. (2002) Sustentabilidade da produção de florestas plantadas na região tropical. In: Alvarez V.; Schaefer,

- C.E.G.R.; Barros, N.F.de; Costa, L.M. da; eds. *Tópicos em Ciência do solo*. Viçosa, SBCS, p.487-592.
- Bataglia, O.C.; Furlani, A.M.C.; Teixeira, J.P.F.; Furlani, P.R.; Gallo, J.R. (1983) Métodos de análise química de plantas. *Campinas, Instituto Agrônomo*, 48p. (Boletim Técnico, 78)
- Beare M. H., Coleman D. C., Crossley D. A. Jr., Hendrix P. F. and Odum E. P. (1995) A hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling. *Plant and Soil* 170, 5-22.
- Bertrand, H., Nalin, R., Balli, R., Cleyet-Marel, J.C. (2001) Isolation and identification of the most efficient plant growth promoting bacteria associated with canola (*Brassica napus*). *Biology and fertility soils*, 33, p.142-156.
- Bonito, G. M.; Coleman, D. C.; Haines, B. L.; Cabrera, M. L. (2002) Can nitrogen budgets explain differences in soil nitrogen mineralization rates of Forest stands along an elevation gradient. *Forest Ecology and Management*, Amsterdam, v. 5991, p. 1-12,
- Borneman, J.; Triplett, E.W. (1997) Molecular Microbial Diversity in Soils from Eastern Amazonia: Evidence for Unusual Microorganisms and Microbial Population Associated with Deforestation. *Applied and Environmental Microbiology*, v.63, p.2647-2653.
- Bossio, D.A., Scow, K.M. (1998) Impacts of carbon and flooding on soil microbial communities: phospholipid fatty acid profiles and substrate utilization patterns. *Microb. Ecol.*, 35, p.265-278.
- Bothe, H., Jost, G., Schloter, M., Ward, B.B., Witzel, K. (2000) Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiol Rev.*, 24, p.673-690
- Boyle, S. A., Rich, J. J., Bottomley, P. J., Cromack, J. K., Myrold D. D. (2006). Reciprocal transfer effects on denitrifying community composition and activity at forest and meadow sites in the Cascade Mountains of Oregon. *Soil Biology and Biochemistry* 38, p.870-878.
- Braga, J.M., Defelipo, B.V. (1974) Determinação espectrofotométrica de fósforo em extrato de solo e material vegetal. *R.Ceres*, 21, p.73-85.
- Braker, G., Fesefeldt, A.; Witzel, K. P. (1998) Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (nirK and nirS) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, p.3769-3775.
- Bremer, J. M., Mc Carty, G. W. (1993) Inhibition of nitrification in soil by allelochemicals derived from plants and plant residues. *Soil Biochemistry*, 8:181-218.

- Breslauer, K.J., Frank, R., Blocher, H., Marky, L.A. (1986) Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.*, v.83, p.3746-3750.
- Brinkmann, W.L.F.; Nascimento, J.C. (1973) The effect of slash and burn agriculture on plant nutrients in the Tertiary Region of Central Amazônia. *Acta Amazônica*, Manaus, p.355-61.
- Brookes, P.C. (1995) The use of microbial parameters in soil pollution by heavy metals. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v.19, n.4, p.269-279.
- Burle, M.L.; Mielniczuk, J.; Focchi, S. (1997) Effect of cropping systems on soil chemical characteristics with emphasis on soil acidification. *Plant Soil*, v.190, p.309-316.
- Calvó, L., Vila, X., Abella, C.A., Garcia-Gil, L.J. (2004) Use of the ammonia-oxidizing bacterial-specific phylogenetic probe Nso1225 as a primer for fingerprint analysis of ammonia-oxidizer communities. *Appl Microbiol Biotechnol*, 63, p.715-721.
- Camargo, F. A. O., Gianello, C.; Tedesco, M. J., Vidor, C. (1999) Nitrogênio orgânico no solo, p 117 - 137. In: Santos, G. A.; Camargo, F. A. O. *Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais*. Porto Alegre: Gênese, p.118-133.
- Carmo, J. B.; Andrade, C.A.; Cerri, C.C.; Piccolo, M.C. (2005) Disponibilidade de nitrogênio e fluxos N₂O a partir de solo sob pastagem após aplicação de herbicidas *Rev. Bras. Ci. Solo*, v.29, p.735-746.
- Carter, M. R. (1986) Microbial biomass and index for tillage-induced changes in soil biological properties. *Soil & Tillage Research*, Amsterdam, v. 7, n. 1, p. 29-40.
- Cattelan, A. J.; Vidor, C. (1990) Sistemas de culturas e a população microbiana do solo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. Campinas, v. 14, n. 2, p. 125-133.
- Cattelan, A.J.; Gaudêncio, C.A.; Silva, T.A. (1997) Sistemas de rotação de culturas em plantio direto e os microrganismos do solo, na cultura da soja, em Londrina. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v.21, p.293-301, 1997.
- Cebon, A., Coci, M., Garnier, J., Laanbroek, H. J. (2004) Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Ammonia-Oxidizing Bacteria Community Structure in the Lower Seine River: Impact of Paris Wastewater Effluents. *Applied Environmental Microbiology*, p. 6726–6737.
- Cerri, C.C.; Andreux, F.; Eduardo, B.P. (1992) O ciclo do carbono no solo. In: Cardoso, E.J.B.N.; Tsai, S.M.; Neves, M.C.P. *Microbiologia do solo*. Campinas: SBCS. p.73-90.

- Chadwick, O.A., Derry, L.A., Vitousek, P.M., Huebert, B.J., Hedin, L.O. (1999) Changing sources of nutrients during four million years of ecosystem development. *Nature* 397, p.491-497.
- Christensen, M. (1989) *A view of fungal ecology. Mycologia*, v.81, p.1-19.
- Clarke, K. R.; Warwick, R. M. (1994) Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation. *Natural Environmental Research Council*, UK, 144p.
- Clegg, C. D.; Ritz, K.; Griffiths, B.S. (2000) % G1C profiling and cross hybridization of microbial DNA reveals great variation in below-ground community structure in UK upland grasslands. *Applied Soil Ecology*, 14, p.125–134.
- Colozzi Filho, A.; Balota, E. L., Andrade, S. (1999) Microrganismos e processos biológicos nos sistema plantio direto. In: *SIQUEIRA, J. O. et al. ed. Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas. Lavras : SBCS/UFLA*, p.487-508.
- Constantinides, M., Fownes, J.H. (1994) Nitrogen mineralization from leaves and litter of tropical plants: relationship to nitrogen, lignin and soluble polyphenol concentrations. *Soil Biochem.*, 26, p.49-55.
- Costa, G.S., Andrade, A.G., Faria, S.M. de (1997) Aporte de nutrientes pela serapilheira de *Mimosa Caesalpiniiifolia* (Sabia) com seis anos de idade. *Anais do III Simposio Nacional de Recuperação de Areas degradadas*, Ouro Preto-MG, p.344-349.
- Coutinho, H.L.C., Oliveira, V.M., Manfio, G.P. & Rosado, A.S. (1999) Evaluating the microbial diversity of soil samples: methodological innovations. *Anais Academia Brasileira de Ciências* 71, p.491-503, 1999.
- Coûteaux, M.M, Bottner, P., Berg, B. (1995) Litter decomposition, climate and litter quality. *Trends in Ecology & Evolution*, 10, p.63-66.
- Crutzen, P.J. (1981) Atmospheric chemical processes of the oxides of nitrogen, including nitrous oxide. In: Delwiche, C.C. (ed.). *Denitrification, nitrification and atmospheric nitrous oxide*. New York, John Wiley. p.17-44.
- Dauber, J., Wolters, V. (2000) Microbial activity and functional diversity in the mounds of three different and species. *Soil Biology and Biochemistry*, v.32, p.93-99.
- Davies, R.I.; Coulson, C.B.; Lewis, D.A. (1964) Polyphenols in plant humus and soil: 3. *J. Soil Sci.*;15:229-309.
- De Fede, K. L., Panaccione, D. G., Sextone, A. J. (2001) Characterization of dilution enrichment cultures obtained from size-fractionated soil bacteria by Biolog community-level physiological profiles and restriction analysis of 16S rDNA genes. *Soil Biol. Biochem.*, 33, p.1555-1562.

- Defelipo, B.V., Ribeiro, A.C. (1981) Análise química do solo. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 17p. (Boletim de Extensão, 29)
- Degans, B. P., Schipper, L. A., Sparling, G. P., Vojvodic-Vukovic, M. (2000) Decreases in organic C reserves in soils can reduce the catabolic diversity of soil microbial communities, *Soil Biology and Biochemistry*, 32, p.189-196.
- Del Moral, R., Müller, C.H. (1970) The allelopathic effects of *Eucalyptus calmadulensis*. *American Midland Naturalist*, v.83, n.1, p.160-200.
- De-Polli, H.; Franco, A. A.; Almeida, D. L.; Duque, F. F.; Monteiro, E. M. S. & Döbereiner, J. (1988) *A biologia do solo na agricultura*, Seropédica, EMBRAPA / UAPNBS, 48p. (Documentos, 5).
- D'Haene, K.; Moreels, E.; De Neve, S.; Daguilar, B.C.; Boecky, P.; Hofman, G.; Cleemput, O.V. (2003) Soil properties influencing the denitrification potential of Flemish agricultural soils. *Biol. Fertil. Soils*, 38, p.358-366.
- Díaz-Raviña, M., Baath, E. (1996) Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, p.2970-2977.
- Dilly, O.; Munch, J.C. (1996) Microbial biomass content, basal respiration and enzyme activities during the course of decomposition of leaf litter in a Black Alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) Forest. *Soil Biology and Biochemistry*, 28 (8), p.1073-1081)
- Doran, J. W.; Coleman, D. C.; Bezdicek, D. F.; Stewart, B. A. (Eds.). (1994) *Defining soil quality for a sustainable environment*. Wisconsin: American Society of Agronomy.
- Drozdowicz, A.G. (1991) Microbiologia ambiental. In: Roitman, I.; Travassos, L.R.; Azevedo, J.L. (1991) Tratado de microbiologia. Rio de Janeiro: Manole, v.2, p.1-102.
- Duguma, B.; Kang, B.T.; Okali, D.U.U. (1988) Effect of liming and phosphorus application on performance of *Leucaena leucocephala* in acid soils. *Plant and Soil*, Dordrecht, v.110, p.57-61.
- Ecosystemas (2001) *Caatinga*, Lojinha do wwf- webmaster@conservatio.org
- Ekblad, A.; Hogberg, P. (2001) Natural abundance of ¹³C in CO₂ respired from forest soils reveals speed of link between photosynthesis and root respiration. *Oecologia*. v. 127, n.3, p.305-308.
- Embrapa. (1997) *Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos. Manual de Métodos de Análise de Solos*. 2. ed. Rev. Atual. Rio de Janeiro, SNLCS.
- Engelen, B., Meiken, K., Witzingerode, F., Heuer, H., Malkomes, P.H., Backhaus, H. (1998) Monitoring impact of a pesticide treatment on bacterial

soil communities by metabolic and genetic fingerprint in addition to conventional testing procedures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, p.2814-2821.

- Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. (1995) *Introdução ao uso de marcadores moleculares RAPD e RFLP em análise genética*. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. p.220 (Embrapa-Cenargen Documento 20).
- Forreter, D.I., Bausch, J., Khanna, P.K., (2004) Growth dynamics in a mixed-species plantation of *Eucalyptus globulus* and *Acacia mearnsii*. *Forest Ecology and Management*, v.193, p.81-95.
- Forreter, D.I., Bausch, J., Cowie, A.L. (2005) On the success and failure of mixed-species tree plantations: lessons learned from the model system of *Eucalyptus globulus* and *Acacia mearnsii*. *Forest Ecology and Management*, v.209, p.147-155.
- Franco, A. A.; Dobereiner, J. (1994) A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. *Summa phytopathologica*, JAGUARIÚNA, v. 20, p. 68-74.
- Franco, A.A.; Dias, L.E.; Faria, S. M.; Campello, E.F.C.; Silva, E.M.R. (1995) Uso de leguminosas florestais noduladas e micorrizadas como agentes de recuperação e manutenção da vida do solo: um modelo tecnológico. *Oecol. Bras.*, 1, p.459-467.
- Franco, A.A., Faria, S.M. (1997) The contribution of N₂-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. *Soil Biochem.*, 29, p.897-983.
- Freitag, T. E., Prosser, J. I. (2003) Community structure of ammonia-oxidizing bacteria within anoxic marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 69, p.1359-1371.
- Froufe, L.C.M (2003) Decomposição de folhas de plantios de eucalipto e pupunha em um fragmento da Mata Atlântica no Norte Fluminense. 142f. Tese (Doutorado em produção vegetal). UENF. Campos dos Goytacazes-RJ.
- Gama-Rodrigues, E.F; Barros, N.F.; Gama-Rodrigues, A.C.; Santos, G.A. (2005) Nitrogênio, carbono e atividade da biomassa microbiana do solo em plantações de eucalipto. *R. Bras. Ci. Solo*, 29, p.893-901.
- Garbeva, P., van veen, J.A., van Elsas, J.D. (2004) Microbial diversity in soil: Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology*, 42, p. 243-270.
- Germida, J.J., Siciliano, S.D., Freitas, J.R., Seib, A.M., (1998) Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus*) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiology Ecology*, 26, p.43-50.
- Giacomini, S.J., Jantalia, C.P., Aita, C., Urquiaga, S.S., Alves, B.J.R. (2006) Emissão de óxido nitroso com a aplicação de dejetos líquidos de suínos em

- solo sob plantio direto. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.41, n.11, p.1653-1661.
- Grayson, S. J.; Griffiths, G. S.; Mawdesley, J. L.; Campbell, C. D., Bardgett, R. D. (2001) Accounting of variability in soil microbial communities of temperate upland grassland ecosystem. *Soil Biol. Biochem.*, 33, p.533-551.
- Goi, S. R.; Sprent, J. I.; James, E. K.; Jacob-Neto, J. (1992) Influence of nitrogen form on the nitrogen fixation of *Acacia auriculiformis*. *Symbiosis*, 82, p.505-512.
- Goi, S. R.; Sprent, J. I.; Jacob-Neto, J. (1997) Effect of different sources of N on the structure of *Mimosa caesalpiniaefolia* root nodules. *Soil Biol. Biochem.* 29, p.983-987.
- Goodfriend, W.L. (1998) Microbial community patterns of potential substrate utilization: a comparison of salt marsh, sand dune, and seawater-irrigated agronomic systems. *Soil Biology and Biochemistry*, v.30, p.1169-1176.
- Griffiths, B.S.; Ritz, K.; Ebbelwhite, N.; Dobson, G. (1999) Soil microbial community structure: effects of substrate loading rates. *Soil Biol. Biochem.*, v.31, p.145-133.
- Grisi, B. M. (1995) Biomassa e a atividade de microorganismos do solo: revisão metodológica. *Revista Nordestina de Biologia*, 10: p.1-22.
- Gupta, V. V. S. R. & Germida, J. J. (1988) Distribution of microbial biomass and its activity in soil aggregate size classes as affected by cultivation. *Soil Biology and Biochemistry*. 20, p.777-786.
- Halloway, J.D.; Stork, N.D. (1991) *The dimensions of biodiversity: the use of invertebrates as indicators of human impact*, In: Hawksworth, H.D., (Ed.) *The biodiversity of microorganisms and invertebrates: its role in sustainable agriculture*. Wallingford, Oxon, Ox 10 8DE, p.37-63.
- Hamilton, J.G., Thomas, R.B., Delucia, E.H. (2001) Direct and indirect effects of elevated CO₂ on leaf respiration in a forest ecosystem. *Plant Cell environment*, 24, p.975-982.
- Hardy, R. W. F., Holsten, R.D., Jackson, E.K., Burns, R.C. (1968) The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology* 43, p.1185-1207.
- Hart, S.C.; Stark, J.M.; Davidson, E.A.; Firestone, M.K. (1994) Nitrogen mineralization, immobilization and nitrification. In: Weaver, R.W. (ed.) *Methods of soil analysis. Part 2: Microbiological and Biochemical Properties*. *Soil Science Society of America, Inc.* p. 985-1017.
- Hedin, L.O., Vitousek, P.M., Matson, P.A. (2003) Pathways and implications of nutrient losses during four million years of tropical forest ecosystem development. *Ecology* 84 (9), p.2231-2255

- Heuer, H.; Smalla, K. (1997) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis for studying soil microbial communities,. In *Van Elsas, J.D., Wellington, E.M.H., Trevors, J. (ed.), Modern Soil Microbiology*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y, p. 353-373.
- Hu, S. J., Van Bruggen, A. H. C., Grunwald, N. J. (1999) Dynamics of bacterial populations in relation to C availability in a residue-amended soil. *Appl. Soil Ecol.*, 13, p.21-30.
- Hugenholtz, P.; Pace, N.R. (1996) Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. *Trends in Biotechnol.* 14, p.190-197.
- Ilies, P., Mavinic, D.S. (2001) The Effect of Decreased Ambient Temperature on the Biological Nitrification and Denitrification of a High Ammonia Landfill Leachate. *Water Research. Britain*.Vol. 35, N° 8, p. 2065-2072.
- Jetten, M.S.M.; Strous, M.; Van De Pas-Schoonen, K.T.; Schalk, J.; Van Dongen, U.G.J.M.; Van De Graaf, A. A.; Logemann, S.; Muyzer, G.; Van Loosdrecht, M.C.M.; Kuenen, J.G.. (1999) The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiology Reviews* 22, p. 421-43.
- Jetten, M.S.M.; Sliemers, A. O.; Third, K. A.; Abma, W.; Kuenen, J.G.. (2003) Canon and Anammox in a gas-lift reactor. *FEMS Microbiology Letters* 218, p. 339-344.
- Johnson, M. J.; Lee, K. Y.; Scow, K. M. (2003) DNA fingerprint reveals links among agricultural crops, soil properties, and the composition of soil microbial communities. *Geoderma*, Amsterdam, v. 114, n. 3/4, p. 279-303.
- Joshi S.R., Sharma G.D, Mishra R.R., (1993) Microbial enzyme activities related to litter decomposition near a highway in a subtropical forest of North East India, *Soil. Biol. Biochem.* 25, p.1763-1770.
- Kaiser, O., Puhler, A., Selbitschka, W., (2001) Phylogenetic analysis of microbial diversity in the rizoplane of oilseed rape (*Brassica napus* cv.Westar) employing cultivation-dependent and cultivation-independent approaches. *Microbial Ecology*, 42, p.136-149.
- Kannegiesser, U. (1990) Apuntes sobre algunas acacias australianas. 1.-*Acacia mearnsii* De Willd. *Ciencia e Investigación Forestal*, v.4, n.2, p.198-202.
- Keller, M.; Veldkamp, E.; Weitz, A.M.; Reiners, W.A. (1993) Effect of pasture age on soil trace-gas emissions from a deforested area of Costa Rica. *Nature*, 365, p.244-246.
- Kennedy, A . C. & Smith,K.L. (1995) Soil microbial diversity and the sustainability of agricultura soils. *Plant and Soil*,170, p.75-76.
- Kennedy, A.C. (1999) Bacterial diversity in agroecosystem. *Agriculture Ecosystem and Environmental*. V.74, n.1, p. 65-76.

- Kögel-Knabner, I. (2002). The Macromolecular Organic Composition of Plant and Microbial Residues as Inputs to Soil Organic Matter. *Organic Matter. Soil Biology and Biochemistry* 34 p.139-162.
- Kovács, M. (1992) *Biological Indicators in Environmental Protection*. Akadémia Kiadó é Nyomda Vállat, Budapest, 200p.
- Kowalchuk, G.A.; Stephen, J.R.; De Boer, W.; Prosser, J.I.; Embley, T.M.; Woldendorp, J.W. (1997). Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the Subdivision of the class *Proteobacteria* in coastal sand dunes by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S Ribosomal DNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, p.1489-1497.
- Kowalchuk, G.A., Stienstra, A.W., Heilig, G.H., Stephen, J.R., Woldendorp, J.W. (2000) Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacteria in soil of successional grasslands of the Drentsche A (The Netherlands). *FEMS Microbiol Ecol*, 31, p.207-215
- Kroeze, C. (1993) Global warming by halocarbons and nitrous oxide. PhD Thesis, University of Amsterdam, p.187.
- Lavelle, P. (2000) Ecological challenges for soil science. *Soil Science*, Washington, v. 165, n. 1, p. 73-86.
- Leita, L.; Nobile, M; de; Muhlbachova, G.; Mondoni, C.; Marchiol, L.; Zerbi, G. (1995) Bioavailability and effects of heavy metals on soil microbial biomass survival during laboratory incubation. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v.19, n.2-3, p.103-108.
- Leitão Filho, H.F. (1987) *Considerações sobre a florística de florestas tropicais e subtropicais do Brasil*. IPEF, Piracicaba, 35: p.41-46.
- Lensi, R., Mazurie, S., Gourbiere, F., Josserand, A. (1986) Rapid determination of the nitrification potential of an acid forest soil and assessment of its variability. *Soil Biology and Biochemistry* 18, p.239-240.
- Liu, X.; Tiquia, S.M.; Holguin, G.; Wu, L.; Nold, S.C.; Devol, A.H.; Luo, K.; Palumbo, A.V.; Tiedje, J.M.; Zhou, J. (2003) Molecular Diversity of Denitrifying Genes in Continental Margin Sediments within the Oxygen-Deficient Zone off the Pacific Coast of Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, p.3549-3560.
- López, A., Jesus, H.S. de, Rocha, M. de M., Fries, M., Urquiaga, S., Alves, B.J.R. (1998) *Diagnóstico do potencial de nitrificação e desnitrificação em solo sob pastagens de Bracharia sp. e solo sob plantio direto e convencional*. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, nov. 1998. 24p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 78).
- Loreau, M. (2001) Microbial diversity, producer-decomposer interaction and ecosystem processes: a theoretical model. *Proceedings: Biological Sciences*, London, v. 268, p. 303-3098.

- Louzada, M.A.P.; Quintela, M.F.S.; Penna, L.P.S. (1995) Estudo comparativo da produção de serapilheira em áreas de Mata Atlântica, floresta secundária “antiga” e uma floresta secundária (capoeira). *Oec. Bras.*, 1:61-74.
- Lupwayi, N.Z., Arshad, M.A., Rice, W.A., Clayton, G.W. (2001) Bacterial diversity in water-stable aggregates of soils under conventional and zero tillage management. *Applied Soil and Ecology*, v.16, p.251-261.
- Magurran, A.E. (1988) *Ecological Diversity and its Measurement*. New Jersey: Princeton University Press. 179p.
- Marchiori Jr. M.; Melo, W.J. (1999) Carbono, carbono da biomassa microbiana e atividade enzimática em um solo sob mata natural, pastagem e cultura do algodoeiro. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 23, p.257-263.
- Margalef, R. (1958) Temporal succession. In: *Pouzza, T., Travers, M. Perspective in marine biology Berkeley*. University of California (eds). p. 323-347.
- Marscher, H., Römheld, V. (1983) In vivo measurement of root-induced pH changes at the soil-root interface: effect of plant species and nitrogen source, *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*. 111, p.241-251.
- Marschner, P., Kandeler, E., Marschner, B. (2003) Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biol. Bioch.*, 35, p.453-461.
- Matson, P.A.; Vitousek, P.M.; Ewel, J.J.; Robertson, G.P. (1987) Nitrogen Transformations Following Tropical Forest Felling and Burning of a Volcanic Soil. *Ecology*, 68: p.491-502.
- McCaig, A. E., L. A. Glover, and J. I. Prosser. (2001) Numerical analysis of grassland bacterial community structure under different land management regimes by using 16S ribosomal DNA sequence data and denaturing gradient gel electrophoresis banding patterns. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, p.4554–4559.
- Melillo, J.M.; Steudler, P.A.; Feigl, B.J.; Neill, C.; Garcia, D.; Piccolo, M.C.; Cerri, C.; Tian, H. (2001) Nitrous oxide emissions from forests and pasture of various ages in the Brazilian Amazon. *J. Geophys. Res.*, 106:179- 188.
- Melloni, R.; Pereira, E. G.; Trannin, I. C. B.; Santos, D. R. dos; Moreira, F. M. S.; Siqueira, J. O. (2001) Características biológicas de solos sob mata ciliar e campo cerrado no sul de Minas Gerais. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 25, n. 1, p. 7-13.
- Melo, I. S. & Valadares, M. V. I. (1998). In: *Melo, I., S. & Azevedo, J., L. de (eds), Métodos de extração de DNA e sua aplicação em estudos genéticos e ecológicos*. Ecologia Microbiana p. 187-200.

- Mendonça, E. S., Loures, E. G. (1996) Matéria orgânica do solo. In: *Apostila de Fertilidade do Solo*. Viçosa. Imprensa Universitária. p. 118-147.
- Minchin, F. R., Witty, J.F., Mytton, L.R. (1994) Reply to "Measurement of nitrogenase activity in legume root nodules: in defence of the acetylene reduction assay." *Plant and Soil* 158, p.163-167.
- Monteiro, M. T. (2001) Carbono, Nitrogênio e Atividade da Biomassa Microbiana: indicadores de Qualidade do Solo e da Serapilheira em Sítios Florestais do Norte Fluminense. Campos dos Goytacazes, Universidade Estadual do Norte Fluminense, 75p. (Tese de Mestrado)
- Monteiro, M. T., Gama-Rodrigues, E.F. (2004) Carbono, nitrogênio e atividade da biomassa microbiana em diferentes estruturas de serapilheira de uma floresta natural. *R. Bras. Ci. Solo*, 28, p.819-826.
- Moore R., Anderson A. R., Ray D., Walker C., Pyatt D. G., Evans H. F., Carter C. I., Straw N. A., Wainhouse D. and Winter T. G. (1995) Soil biodiversity: a literature review. *Scottish Natural Heritage*, No 17.
- Moraes, J.F.L. (1991) Conteúdos de carbono e tipologia de horizontes nos solos da bacia Amazônica. Piracicaba: CENA/USP, 1991. 84p. *Dissertação de Mestrado*.
- Moreira, F.M.S., Siqueira, J.O. (2002) *Microbiologia e bioquímica do Solo*. Minas Gerais, p.231-232.
- Mullis, K., Faloona, F. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Method in Enzymology*, v.55, p.335-350.
- Muyzer, G.; De Waal, E.C.; Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 p.695-700.
- Muyzer, G., Brinkhoff, T., Nübel, U., Santegoeds, C., Schäfer, H., Wawer, C., (1998) Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. In: Akkermans, A.D.L., Van Elsas, J.D.; De Bruijn, F.J., (Eds). *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands p.1-23.
- Muyzer, G., Smalla, K (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Mini review. *Antonie van Leeuwenhoek* 73:127-141.
- Muyzer, G. (1999) Genetic fingerprinting of microbial communities – present status and future perspective. In: *International Symposium of Microbial Ecology*, 8, Halifax. <http://www.plato.acadiau.ca/isme/symposium16/muyzer.pdf> (9 Mar. 2002)

- Myers, R.M., Fischer, S.G., Lerman, L.S., Maniatis, T., (1985) Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, 13, p .3131-3145.
- Ndaw, S.M. (2003) Diversidade, biomassa e atividade microbiana como indicadores de qualidade do solo e da serapilheira em sítios sob diferentes coberturas vegetais na região Norte Fluminense. Campos dos Goytacazes, Universidade Estadual do Norte Fluminense, 98p. (Tese de Mestrado)
- Neill, C.; Garcia-Montiel, D.C.; Piccolo, M.C.; Steudler, P.A.; Melillo, J.M.; Feigl, B.J.; Cerri, C. (1995) Nitrogen dynamics in soils of forest and active pasture in the western Brazilian Amazon basin. *Soil Biol. Biochem.*, 27:1167-1175.
- Neill, C.; Garcia-Montiel, D.C.; Piccolo, M.C.; Cerri, C.; Steudler, P.A.; Melillo, J.M.; Brito, M. (1997) Net nitrogen mineralization rates in soils following deforestation for pasture across the southwestern Brazilian Amazon Basin Landscape. *Oecologia*, 110:243-252.
- O'donnel, A.G.; Gorres, H. (1999) *16S rDNA methods in soil microbiology. Current Opinion in Biotechnology*. v.10, p.225-229.
- Odum, E. P. (1988) Populações em comunidades. *In: Odum, E.P., Eds., Ecologia*. São Paulo: Guanabara, p. 258-272.
- Ogram, A.; Saylor, G.S. & Barkay, T.J. (1987) The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J. Microbiol. Methods* 7, p.57-67.
- Oliveira, R.R.; Lacerda, L.D. (1993) Produção e composição química da serapilheira na Floresta da Tijuca (RJ). *R. Brasil. Bot.*, 16:93-99.
- Orlov, D.S. (1995) *Humic Substances os Soils and General Theory of Humification*. Balkema, Canada, 323p.
- Ovreas, L., Forney, L., Daae, F. L., Torvisk, V. (1997) Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvanet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S r RNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: p.3367-3373.
- Palm, C.A., Gachengo, C.N., Delve R.J., Cadisch, G. & Killer, K.E. (2001.) Organic Inputs for Soil Fertility Management in Tropical Agro ecosystems: Application of um Organic Resource Database, *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 83: p.27-42.
- Pankhurst C. E., Ophel-Keller K., Doube B. M. and Gupta V. V. S. R. (1996) Biodiversity of soil microbial communities in agricultural systems. *Biodiversity and Conservation* 5, 197-209.
- Panilov, N. S. (1999) Understanding and prediction of soil microbial community dynamics under global change. *Applied Soil Ecology*, Amsterdam, v. 11, n. 1, p. 161-176.

- Paoletti, M., G. (1999) Using bioindicators based on biodiversity to assess landscape sustainability. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v. 74 (1-3), p.1-18.
- Patra, A. K. ; Abbadie, L. ; Clays-Josserand, A. ; Degrange, V. ; Grayston, S. J. ; Loiseau, P. ; Louault, F.; Mahmood, S.; Nazaret, S.; Philippot, L.; Poly, F.; Prosser, J.I.; Richaume, A.; Le Roux, X. (2005) Effects of grazing on microbial functional groups involved in soil N dynamics. *Ecological Monographs*, 75(1), p.65-80.
- Paul, E.A.; Clark, F.E. (1989) *Soil microbiology and biochemistry*. San Diego: Academic Press, 1989. 273p.
- Pereira, J. C.; Neves, M. C. P.; Drozdowicz, A. (1999) Dinâmica das populações bacterianas em solos de cerrados. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.34, n5, p.801- 811.
- Perry, D. A.; Amaranthus, M. P.; Borchers, J. G.; Borchers, S. L.; Brainerd, R. E. (1989) Bootstrapping in ecosystems. *Bioscience*. 39, p.230-237.
- Philippot, L.; Piutti, S.; Martin-Laurent, F.; Hallet, S.; Germon. J. C. (2002) Molecular analysis of the nitrate-reducing community from unplanted and maize-planted soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, p.6121–6128.
- Piccolo, M.C.; Neill, C.; Cerri, C. (1994) Net Mineralization and Net Nitrification Along a Tropical Forest-to-Pasture Chronosequence. *Plant and Soil* 162: p. 61-70.
- Pimm, S. L. & R.A.Askins. 1995. Forest losses predict bird extinctions in eastern North America. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 92: 9343-9347.
- Pimm, S.L., G.J. Russel, J.G. Gittleman & T.M. Brooks. 1995. The future of biodiversity. *Science*, 347-350.
- Pinto, C. (2001) Contribuição de espécies arbóreas de diferentes fases sucessionais da Floresta Ombrófila Densa das Terras Baixas para ciclagem de nutrientes minerais, Floresta Estadual do Palmito, Paranaguá, PR. Curitiba, 2001. 68p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal), Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.
- Pompéia, S. L. (1994) Procedimentos técnicos para recuperação de áreas degradadas por poluição. In: *I Simpósio Sul-Americano e II Simpósio Nacional de recuperação de Áreas degradadas*. Curitiba. Anais...Curitiba. 679p.
- Postgate, J. R. The fundamentals of nitrogen fixation. (1987) *Cambridge: Cambridge University Press*, 252p.

- Priemé, A.; Timmis, K. N.; Nedwell D. B.; Osborn, A. M. (2002) Diversity of nitrite reductase (nirK and nirS) gene fragments in forested upland and westland soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, p.1893-1900.
- Primack, R.B. (1993) *Essentials of Conservation Biology*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, 564 p.
- Rapport, R.L. (1983) Indicators of water quality from an ecosystem perspective. manuscript for "*Informal Meeting on Water Use and Quality Statistics*" at *Conference of European Statisticians*, Geneva, 12-14 Dec. Statistics Canada, Ottawa, Ont. 12 p.
- Raven, J.A., Franco, A.A., Jesus, E.L. de, Jacob-Neto, J. (1990) H⁺ extrusion and organic acid synthesis in N₂-fixing symbioses involving vascular plants. *New phytologist*, 114, p.369-389.
- Reiners, W.A.; Bouwman, A.F.; Parsons, W.F.J.; Keller, M. (1994) Tropical rain forest conversion to pasture: Changes in vegetation and soil properties. *Ecol. Appl.*, 4:363- 377.
- Rice, E. L. (1984) *Allelopathy*. Academic Press, Inc New York
- Rigaud, J.; Puppo. A. (1977) Effect of nitrite upon leghaemoglobin and interaction with nitrogen fixation. *Biochem. Biophys. Acta*, 497, p.702-706.
- Rogers, B.F.; Tate III. (2001) Temporal analysis of the soil microbial community along a toposequence in Pineland soils. *Soil Biology and Biochemistry*, v.33, n.10, p.1389-1401.
- Rosado, A.S.; Seldin, L.; Wolters A.C. & Van Elsas, J.D. (1996) Quantitative 16S rDNA-targeted polymerase chain reaction and oligonucleotide hybridization for detection of *Paenibacillus azotofixans* in soil and the Wheat rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 19, p.153-164.
- Rosado, A.S., Duarte, G.F., Seldin, L., Van Elsas, J.D. (1997) Molecular Microbial Ecology: a minireview. *Rev. Microbiol.* 28: 135-147.
- Rosado, A. S. (2000) Diversidade e ecologia de microrganismos do solo. *In: Reunião Brasileira de Fertilidade e Nutrição de Plantas, 23; Reunião Brasileira Sobre Micorrizas, 7; Simposio Brasileiro de Microbiologia do Solo, 5; Reunião Brasileira de Biologia do Solo, 2, 2000, Santa Maria. Anais...* Santa Maria: UFSM, 2000. CD-ROM..
- Rosado, A.S., Duarte, G.F. (2002) Utilização de eletroforese em gel com gradientes de desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura para estudar a diversidade microbiana. *In: Genética e melhoramento de microrganismos. Mello, I.S. (ed). EdUSP, São Paulo, p.97-129.*
- Ross, D.J. Speir, T.W.; Kettles, H.A.; Tate, K.R.; Mackay, A.D. (1995) Soil Microbial Biomass, C and N Mineralization. And Enzyme Activities in Hill Pasture: Influence of Grazing Management. *Australian Journal of Soil Research*, 33: p.943-959.

- Rowan, A.K., Snape, J.R., Fearnside, D., Barer, M.R., Curtis, T.P., Head, I.M. (2003) Composition and diversity of ammonia-oxidizing bacterial communities in wastewater treatment reactors of different design treating identical wastewater. *FEMS Microbiol Ecol*, 43, p.195-206
- Rustead, L.E.; Huntington, T.G.; Boone, R.D. (2000) Controls on soil respiration: implications for climate change. *Biogeochemistry*, v. 49, n. 1, p. 1-6.
- Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Horn, G.T.; Mullins, K.B. & Erlich, H.A. (1998) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, p.487-494.
- Santos, D.R. dos (2000) Fósforo, fungo micorrízico e Azorhizobium na produção de fitomassa e nutrição de *Sesbania virgata* e *Sesbania rostrata*. *Dissertação (Mestrado em Agronomia/Solo e Nutrição de Planta)*, Lavras-MG, Universidade Federal de Lavras, MG, 88p.
- Scala, D. J.; Kerkhof, L. J. (1998) Nitrous oxide reductase (nosZ) genes specific PCR primers for detection of denitrifiers and three nosZ genes from marine sediments. *FEMS Microbiol. Lett.*, 162, p.61-68
- Serrana, 2000 http://www.serrana.com.br/Boletins/Fertilizantes/4_2000/dinamica_nitro.pdf.
- Shannon, C. E., Weaver, W. (1949) The Mathematical Theory of Communication. *University Illinois Press*, Urbana.
- Sheffield, V.C., Cox, D.R., Myers, R.M., (1989) Attachment of a 40bp G+C rich sequence (GC-Clamp) to genomic DNA fragments by polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 86, p.232-236.
- Shrestha, N. K., Hadano, S., Kamachi, T., Okura, I. (2001). Conversion of Ammonium to Dinitrogen in Wastewater by *Nitrosomonas europaea*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. V. 90, p. 221–232.
- Silva Filho, G.N.; Vidor, C. (1984) As práticas de manejo de solo na população microbiana. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. v. 8, n. 5, p. 291-296.
- Silva, I.F.; Mielniczuk, J. (1997) Avaliação do estado de agregação do solo afetado pelo uso agrícola. *Rev Bras Ci Solo*, v.21, p.313-319.
- Simpson, E.H. (1949) Measurement of diversity. *Nature*, v.163, n.4148, p.688.
- Sinsabaugh R.L., Moorhead D.L., Linkins A.E., (1994) The enzymatic basis of plant litter decomposition: emergence of an ecological process, *Appl. Soil Ecol*. 1, p.97-111.
- Siqueira, J. O., Franco, A. A (1988) *Biotecnologia do solo: Fundamentos e Perspectivas*. 1nd. MEC/ESAL/FAEPE/ABEAS/, D.F., Brasília, 236p.

- Siqueira, J.O.; Moreira, F.M.S.; Grisi, B.M.; Hungria, M.; Araujo, R.S. (1994) *Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental*. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. p.142. (Embrapa-CNPAF. Documentos, 45).
- Sliemers, A. O.; Derwort, N.; Campos Gomes, J.L.; Strous, M.; Kuenen, J.G.; Jetten, M.S.S. (2002) Completely Autotrophic Nitrogen Removal over Nitrite in one Single Reactor. *Water Research* 36, p. 2475-2482.
- Smalla, K.; Creswell, L.C.; Mendonça-Hagler, L.C.; Wolters, A. & Van Elsas, J.D. (1993) Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. *J. Appl. Bacteriol.* 74, p.78-85.
- Smalla, K., Wieland, G., Buchner, A., Zock, A., Parzy, J., Kaiser, S., Roskot, N., Heur, H., Berg, G. (2001) Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient electrophoresis: plantdependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, p.4742-4751.
- Smit, E.; Leeflang, P.; Gommans, S.; Van Den Broek, J.; Van, M. S.; Wernars, K. (2001) Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 67, n. 5, p. 2284-2291,
- Smith, M.S., Tiedje, J.M. (1979) The effects of roots on soil denitrification. *Soil. Sci. Soc. Am. J.*, 43: p.951-955.
- Souza, I.M.Z. (2005) Carbono e nitrogênio da biomassa microbiana do solo em áreas reflorestadas comparadas ao campo e mata nativa do Planalto dos Campos Gerais, SC. Lages: UDESC, 2005. 61p. (Dissertação tese de Mestrado em Ciência do Solo).
- Staley, J. T. (1997) *Biodiversity: are microbial species threatened?* *Current Opinion in Biotechnology*, 8, p.340-345.
- Stuedler, P.A.; Melillo, J.M.; Bowden, R.D.; Castro, M.S. (1991) *The Effects of Natural and Human Disturbances on Soil Nitrogen Dynamics and Trace Gas Fluxes in a Puerto Rican Wet Forest*. *Biotropica*, 23 (4): p.356-363.
- Stevenson, F. J. (1986) *Cycles of soil: carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients*. New York: J. Wiley & Sons, 380 p.
- Stevenson, F.J. (1994) Organics forms of soil nitrogen. In: *Humus chemistry; genesis, composition, reactions*. 2.ed. New York, John Wiley & Sons, p.59-95.
- Stewart, G.R.; Pates, J.S.; Unkovich, M. (1993) Characteristics of inorganic nitrogen assimilation of plants in fire-prone Mediterranean type vegetation. *Plant, cell and environment* 16, p.351-363.

- Stouthamer, A.H.; Van'T riet, J.A., Oltmann, L.F. (1980) Respiration of nitrate as acceptor. *In: Knowles, C.J., ed. Diversity in bacterial respiratory systems.* Boca Raton, CRC Press, v.2, p.19-48.
- Sugimoto, N., Nakano, S., Yoneyama, M., Honda, K. (1996) Improved thermodynamic parameters and helix initiation factor to predict stability of DNA duplex. *Nucleic Acid Research*, v.24, p.4501-4505.
- Swift, M.J.; Anderson, J.M. (1993) *Biodiversity and ecosystem Function.* In : *Agricultural Systems:* New York, v.99 p.15-41.
- Tedesco, M.J., Gianello, C., Bissani, C.A., Bohnen, H. & Volkweiss, S.J. (1995) *Análise do Solo, Plantas e Outras Materiais* UFRS, Porto Alegre, 174p.
- Testa, V.M.; Teixeira, L.A.J.; Mielniczuk, J. (1992) Características químicas de um Podzólico Vermelho-Escuro afetadas por sistemas de cultura. *Rev Bras Ci Solo*, v.16, p.107-114.
- Thirukkumaran, C.M., Parkinson, D. (2000) Microbial respiration, biomass, metabolic quotient and litter decomposition in a lodgepole pine forest floor amended with nitrogen and phosphorus fertilizers. *Soil Biology & biochemistry*, 32, p.59-66.
- Tian, G.; Tang, B.C.; Brussaard, L. (1992) Biological effects of plant residues with contrasting chemical compositions under tropical conditions- decomposition and nutrient release. *Soil Biol. Biochem.*, 24, p.1051-1060.
- Tian, G., Brussaard, L., Kang, B.T. (1995) An index for assessing the quality of plant residues and evaluating their effects on soil and crop in the (sub-) humid tropics. *Appl. Soil Ecol.*, 2, p.25-32.
- Tiedje, J.M. (1988) Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. *In: Alexander, J.B.Z., ed. Biology of anaerobic organisms.* New York, John Wiley, 1988. p.179-244.
- Tiedje, J. M., Simkins, S., Groffman, P.M. (1989) Perspectives on measurement of denitrification in the field including recommended protocols for acetylene based methods. *Plant and Soil* 115, p.261-284.
- Tiedje, J. M.; Cho, J. C.; Murray, A.; Treves, D.; Xia, B.; Ahou, J. (2001) Soil teeming with life: new frontiers for soil science. In: Rees, R. M.; Ball, B. C.; Campbell, C. D.; Watson, C. A. (Org.). *Sustainable management of soil organic matter.* Wallingford: CAB International, p. 393-412
- Tomé Júnior, B. (1997) *Manual para interpretação de análise de solo. Guaíba: Agropecuária.* 247p.
- Torsvik, V., Øvreås, L. (2002) Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, Amsterdam, v. 5, n. 3, p. 240–245.

- Trevors, J. (1996) Nucleic acids in the environment. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7, p.331-336.
- Turco, R. F.; Kennedy, A. C.; Jawson, M. D. (1994) Microbial indicators of soil quality. In: Doran, J. W.; Coleman, D. C.; Bezdicek, D. F.; Stewart, B. A. *Defining soil quality for a sustainable environment*. Madison: SSSA.
- Turco, R.F.; Blume, E. (1998) Indicator of Soil Quality. In: Siqueira, J.O.; Moreira, F.M.; Lopes, A.S.; Guilherme, L.R.G.; Faquin, A.E.; Furtini Neto, A.E.; Carvalho, J.M. (Ed.). *Inter-Relação Fertilidade, Biologia do solo, e Nutrição de Plantas*. Lavras: *Sociedade Brasileira de Ciência do Solo*, p.529-550.
- Turner, G. L., Gibson, A.H. (1980) Pages 111–138 in F. Bergersen, editor. *Methods for evaluating biological nitrogen fixation*. John Wiley and Sons, Chichester, UK. Vessey, J. K. 1994. Measurement of nitrogenase activity in legume root nodules: in defense of the acetylene reduction assay. *Plant and Soil* 158, p.151-162.
- Van Elsas, J.D.; Wellington, E.M.H. & Trevors, J.T. (1997) *Modern Soil Microbiology*. New York, Marcel Dekker.
- Van Soest, P., Wine, R. H. (1968) Development of a comprehensive system of feed analysis and its applications to forages. *J. Assoc. Official Agr. Chem.*, Madison, 51: p.780-785.
- Vanlauwe, B.; Diels, J.; Sanginga, N., Merckx, R. (1997) Residue quality and decomposition: An unsteady relationship? In: CADISCH, G. & GILLER, K.E., eds. *Driven by nature: Plant litter quality and decomposition*. Wallingford, CAB International, 1997. p.157-166.
- Vargas, L. K. & Scholles, D. (2000) Biomassa microbiana e produção de C-CO₂ e N mineral de um podzólico vermelho escuro submetido a diferentes sistemas de manejo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Brasília, v. 24, p. 35-42.
- Vaughan, D. (1998) Biodiversity and agricultural practice: why should agriculturists care? Network Paper. Agricultural Administration. *Research and Extension Network*. Overseas Development Institute, Londres v. 82, p. 1-5.
- Veen, J.A.; Van Overbeek, L.S.; Van Elsas, J.D. (1997). Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiology and Molecular Biology Review* v.61 pp. 121-135.
- Veldkamp, E. (1994) Organic carbon turnover in tropical soils under pastures after deforestation. *Soil Science Society of America. Journal*, v.58, p.175-180.
- Veldkamp, E.; Davidson, E.; Erickson, H.; Keller, M.; Weitz, A. (1999) Soil Nitrogen Cycling and Nitrogen Oxide Emissions Along a Pasture

Chronosequence in the Humid Tropics of Costa Rica. *Soil Biology and Biochemistry*, 31: p.387-394.

Verchot, L.V.; Davidson, E.A.; Cattânio, J.H.; Ackerman, I.L.; Erickson, H.E.; Keller, M. (1999) Land use change and biogeochemical controls of nitrogen emissions from soil in eastern Amazon. *Global Biogeochem. Cycles*, 13:31-46.

Vessey, J. K.; Waterer, J. (1992) In search of the mechanism of nitrate inhibition of nitrogenase activity in legume nodules: recent developments. *Physiol. Plant.*, 84, p.171-176.

Vessey, J. K. (1994) Measurement of nitrogenase activity in legume root nodules: in defense of the acetylene reduction assay. *Plant and Soil*, 158:151–162.

Vetriani, C., Jannasch, H.W.; MacGregor, B.J., Stahl, D.A.; Reysenbach, A.H. (1999) Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic *Archeae* in deep-sea sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, v.65, p.4375-4384.

Vidotti, E.C.; Rollemberg, M.C.E. (2004) Algas: Da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. *Quim. Nova*, v.27, p.139-145.

Vitousek, P.; Gosz, J.R.; Grier, C.C.; Melillo, J.M.; Reiners, W.A.; Todo, R.L. (1982) A comparative analysis of potential nitrification and nitrate mobility in forest ecosystems. *Ecological Monographs*, 52, p.155-177.

Von Sperling, M. (2002) Princípio do Tratamento Biológico de Águas Residuárias – Lodos Ativados. Vol. 4. 2ª edição. Editora FCO. UFMG. Belo Horizonte. Minas Gerais.

Waksman, S.A. (1927) Principles of soil microbiology. *Baltimore: The Williams and Wilkins*, 897p.

Walker, B. H. (1992) Biodiversity and ecological redundancy. *Conserv.Biol.* 6, p.18-23.

Wallenstein, M.D.; Myrold, D.D.; Firestone, M.; Voytek, M. (2006) Environmental controls on denitrifying communities and denitrification rates: insights from molecular methods. *Ecological Applications*, 16(6), p.2143-2152.

Wander, M. M.; Traina, B.R. (1994) Organic and conventional management effects on biologically active soil organic matter pools. *Soil Science Society of America Journal*, 58, p.1130-1139.

Whitman, W.B.; Coleman, D.C.; Wiebe, W.J. (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, v.95, p.6578-6583.

- Wollum, A.G. (1982) Cultural methods for soil microorganisms. In: Page, A.L.; Miller, R.H., Keeney, D.R. ed. *Methods of soil analysis*. Soil Science Society of America, Madison, p.781-802.
- Wormald, T.J. Mixed and pure forest plantations in the tropics and subtropics. FAO Forestry Paper 103. Rome, FAO Technical Papers. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1992. 152p.
- Ye, R.W.; Thomas, S.M.. (2001) "Microbial nitrogen cycles: physiology, genomics and application". *Current Opinion in Microbiology*, 4 p. 307-312.
- Yoshinari, T., Hynes, R., Knowles, R. (1977) Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction and measurement of denitrification and nitrogen fixation in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 9:p.177-183.
- Zak, J.C., Willig, M.R., Moorhead, D.L., Wildman, H.G. (1994) Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biology and Biochemistry*, v.26, p.1101-1108.
- Zilli, E.J.R., Rumjanek, N.G., Ribeiro, G.C., Costa, L.H., Neves M.C.P. (2003) Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. *Cad de Ciência & Tec* 20: 391-411
- Zumft, W. G. (1999) The denitrifying prokaryotes. In *Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. (ed.), The prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community*, 3rd ed., release 3.0. Springer-Verlag, New York, N.Y. www.prokaryotes.com