

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ”**

**Diversidade bacteriana em solos da Amazônia: variabilidade
dos gêneros associados ao processo de nitrificação**

Karina Cenciani

Tese apresentada, para obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Microbiologia
Agrícola

**Piracicaba
2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Karina Cenciani
Bióloga

**Diversidade bacteriana em solos da Amazônia: variabilidade dos gêneros
associados ao processo de nitrificação**

Orientadora:
Prof^a. Dra. **BRIGITTE JOSEFINE FEIGL**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Microbiologia
Agrícola

Piracicaba
2007

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Cenciani, Karina

Diversidade bacteriana em solos da Amazônia: variabilidade dos gêneros associados ao processo de nitrificação / Karina Cenciani. - - Piracicaba, 2007. 103 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007. Bibliografia.

1. Amazônia 2. Bactérias 3. Carbono 4. Nitrificação 5. Nitrogênio
6. Sequenciamento genético 7. Solo florestal I. Título

CDD 634.9

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

Ofereço,

*Ao Senhor Jesus, razão maior da minha vida, e por Tua palavra: lâmpada
e luz para os meus caminhos...*

Dedico:

*À minha avó D. Laura, exemplo de amor e dedicação,
Aos meus pais José e Claudete Cenciani, muito obrigada por tudo...
Aos meus irmãos Muriel, Camila e Fernando,*

AMO MUITO VOCÊS!!!

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo e à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela oportunidade de realizar o doutorado.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Brigitte Josefine Feigl, pelo estímulo e apoio em todas as fases deste trabalho, orientação, amizade e agradável convivência.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

À FAPESP, pelo suporte financeiro.

Ao Dr. Jorge Rodrigues, pelo convite em realizar o estágio “sandwich” no Center for Microbial Ecology (CME), amizade e valiosas sugestões para o desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. Dr. Marcio Rodrigues Lambais, do Laboratório de Microbiologia Molecular, pela importante participação e co-orientação neste projeto de pesquisa.

Ao Dr. James M. Tiedje, pesquisador e diretor do Center for Microbial Ecology, por me receber em seu laboratório e pela confiança depositada.

Ao Prof. Dr. Carlos Clemente Cerri, pelas sugestões, apoio e amizade dedicada.

À Antonia Mara Casarin, pela ajuda e eficiência na condução da secretaria da Seção de Biogeoquímica Ambiental.

À Giovana Maria de Oliveira, secretária do PPG Microbiologia Agrícola, que sempre nos socorre nos momentos complicados, e torce pelo sucesso do nosso curso.

Aos técnicos do Laboratório de Biogeoquímica Ambiental: Lílian Campos, Sandra Nicoletti, Dagmar Marchesoni e Gregori Ferrão, pelo apoio na condução das análises químicas e microbiológicas, mas, sobretudo pela amizade.

Aos amigos da Biogeoquímica Ambiental: Dr. Carlos Eduardo Pellegrini Cerri, Carolina Lisboa, Cindy Iglesias, Ciro Righi, Felipe Cury, Gabor Szakacs, João Luís Carvalho, Leidivan Frazão, Marcelo Galdos, Marcos Siqueira, Norberto Noronha, Sandra de Sá, Susian Martins e Stoécio Maia pela amizade e feliz convivência, especialmente nos momentos de aventura nas viagens pra Rondônia.

Aos amigos do Departamento de Solos: Carolina Maluche, Daniele Takahashi, Dilmar Baretta, Gisele Nunes, Helio Kamida, José Pereira, Juliano Cury, Lucas Azevedo, Marcio Morais, Pablo Hardoim, Rafael Armas, Robinson Moresca, Simão

Lindoso, Soraya Kiriachek e ao técnico Wladimir Rosignolo, pelos bons momentos em que estive com vocês, especialmente nas horas do cafezinho.

Ao meu amigo: Maurício Batista Fialho, pela amizade verdadeira e companheirismo durante o período do doutorado na Esalq.

Aos amigos do Center for Microbial Ecology, pelo carinho com que me receberam: Brad Chang, Christina Harzman, Debbie Himes, Débora Rodrigues, Éderson Jesus, Eric Cardenas, Jorge Rodrigues, Lisa Pline, Mary Beth Leigh, Maryam Thompson, Ondřej Uhlik, Peter Bergholz, Shannon Hinsa, Stephan Gantner, Vivian Pellizari, Woo Jun e Yu Yang.

À Dra. Vivian Pellizari, pelas sugestões para a condução dos experimentos, pela amizade e bons momentos durante minha estadia em East Lansing.

Ao amigo e irmão em Cristo Éderson Jesus, que conheci em East Lansing: tua ajuda foi essencial para minha adaptação e realização das análises moleculares no CME. Valeu, e obrigada por tudo!!

Ao Dr. Marcelo Brandão, pelas importantes sugestões e suporte nas análises de bioinformática.

Ao Sr. João Arantes Júnior, que gentilmente nos permitiu o acesso à Fazenda Nova Vida em Rondônia, para a realização desta pesquisa.

Ao Pastor Saulo Jardim, Igreja do Nazareno Jardim Elite, pelas mensagens de encorajamento, exortação e apoio espiritual. Aos amigos e irmãos em Cristo: Ademir e Danusa Cavalari, Catia Casagrande, Evandro Coimbra, Fabio Sartini, Isabel de Deus, Juliana Benites, Júlio e Miriã Stival, Paula Preeg, Reginaldo Silva e Renata Mendes.

Enfim, a todos que, de alguma forma, contribuíram para o sucesso do meu doutorado.

Muito Obrigada!!

“Quero perceber tudo com calma, mesmo em meio a correria, sentir que a vida é quente mesmo quando se diz fria, fazer da vida um canto mesmo sem melodia, amar as pessoas sendo elas João e Maria”.

Mena Moreira

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	13
2 DESENVOLVIMENTO	15
2.1 Revisão de literatura	15
2.1.1 A floresta tropical e a mudança no uso da terra	15
2.1.2 O ciclo do nitrogênio	17
2.1.3 Biomassa microbiana e a especificidade das funções	19
2.1.4 Abordagem molecular da diversidade microbiana	22
2.1.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante	23
2.1.6 Bactérias nitrificadoras em solos da Amazônia	26
2.2 Material e métodos	31
2.2.1 Local de amostragem	31
2.2.2 Caracterização química do solo	36
2.2.3 Carbono e nitrogênio orgânico totais	36
2.2.4 Nitrogênio mineral e taxas líquidas de mineralização e de nitrificação .	36
2.2.5 Carbono e nitrogênio da biomassa microbiana	37
2.2.6 Diversidade do Domínio <i>Bacteria</i>	37
2.2.7 Diversidade das bactérias oxidadoras de amônio e de nitrito	39
2.2.8 Delineamento experimental	46
2.3 Resultados e discussão	47
2.3.1 Propriedades químicas do solo	47
2.3.2 Carbono e nitrogênio orgânico totais	50
2.3.3 Nitrogênio mineral e taxas líquidas de mineralização e de nitrificação .	53
2.3.4 Carbono e nitrogênio da biomassa microbiana	57
2.3.5 Diversidade do Domínio <i>Bacteria</i>	60
2.3.5.1 Estação das chuvas	61
2.3.5.2 Estação seca	62

2.3.6 Correlação entre a diversidade de <i>Bacteria</i> e variáveis ambientais	64
2.3.6.1 Estação das chuvas	64
2.3.6.2 Estação seca	67
2.3.7 Diversidade genética das bactérias oxidadoras de amônio	69
2.3.7.1 Estação das chuvas	69
2.3.7.2 Estação seca	76
2.3.8 Diversidade genética das bactérias oxidadoras de nitrito	83
2.3.8.1 Estação das chuvas	84
2.4 Considerações finais	88
3. CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS	90

RESUMO

Diversidade bacteriana em solos da Amazônia: variabilidade dos gêneros associados ao processo de nitrificação

Os solos da floresta tropical Amazônica supostamente abrigam elevada biodiversidade microbiana, visto que suportam, através da ciclagem da serapilheira, um dos ecossistemas mais exuberantes do planeta. Entretanto, as ações antrópicas de corte e queima, especialmente para o estabelecimento de pastagens, induz mudanças profundas nos ciclos biogeoquímicos, principalmente do nitrogênio. Essas mudanças se manifestam na predominância das formas do N mineral. No solo sob floresta os teores de NO_3^- são semelhantes ou maiores que os de NH_4^+ , enquanto na pastagem praticamente não se encontra NO_3^- . Pastagens mal manejadas, via de regra são abandonadas e reverterem a uma vegetação secundária, ou “capoeira”. As mudanças no uso da terra podem direcionar a predominância de grupos específicos de microrganismos do solo, ou ainda induzir perdas significativas da diversidade como um todo. Para avaliar a extensão do impacto sobre a comunidade microbiana, foram examinadas amostras de solo da camada superficial (0-10 cm) de uma floresta, pastagem e capoeira da região sudoeste da Amazônia. O C e o N orgânico e microbiano, o N mineral nas formas amoniacal e nítrica, as taxas de mineralização e de nitrificação, a diversidade de *Bacteria* por PCR-DGGE e a diversidade de bactérias oxidadoras de amônio e de nitrito por sequenciamento da região ribossomal 16S foram avaliados, durante as estações chuvosa (fevereiro) e seca (setembro) de 2004.

Os resultados indicaram que a área de pastagem bem manejada continha 30 a 42% mais C orgânico do que a capoeira e 47% a mais do que a floresta ao longo do ano. O mesmo padrão foi observado para o N orgânico. O C e o N da biomassa microbiana na pastagem foram 38 e 26%, respectivamente, maiores do que nas áreas de capoeira e floresta durante a estação chuvosa. Entretanto, a falta de umidade durante a estação seca afetou mais intensivamente a biomassa microbiana da pastagem. As relações $\text{C}_{\text{mic}}:\text{C}_{\text{org}}$ e $\text{N}_{\text{mic}}:\text{N}_{\text{org}}$ foram reduzidas acentuadamente neste período, indicando condições impróprias para a utilização do substrato. A concentração de nitrato foi maior

no solo da floresta, enquanto o amônio foi a forma de N mineral predominante na pastagem e na capoeira. As maiores taxas líquidas de mineralização e de nitrificação foram obtidas nos solos de floresta durante a estação das chuvas, enquanto nos demais sistemas os valores foram negativos ou muito baixos.

A abordagem molecular por PCR-DGGE demonstrou que a estrutura das comunidades de *Bacteria* é distinta nos diferentes sistemas de uso da terra. As causas para as variações estão possivelmente relacionadas ao efeito conjunto da cobertura vegetal e das características químicas do solo. A diversidade de bactérias nitrificadoras, avaliada pelo sequenciamento da região ribossomal 16S, foi maior no solo sob pastagem e capoeira do que sob floresta. As seqüências de AOB encontradas apresentaram maior similaridade com as espécies *Nitrosospira* sp., *Nitrosospira multiformis*, *Nitrosospira briensis*, *Nitrosospira tenuis*, *Nitrosovibrio* sp., *Nitrosovibrio tenuis* e *Nitrosolobus multiformis*. A diversidade das NOB apresentou a mesma tendência de aumento da diversidade após a mudança do uso da terra para pastagens. No solo sob floresta os clones encontrados estavam relacionados a uma única espécie de *Nitrobacter* sp., enquanto na pastagem os clones estavam associados às seqüências de *Nitrobacter* sp., *Nitrobacter winogradsky*, *Nitrobacter alkalicus*, *Nitrobacter hamburgensis* e *Nitrobacter vulgaris*. Por sua vez, no solo sob capoeira foram encontradas somente as espécies *Nitrobacter* sp. e *Nitrobacter hamburgensis*.

A elevação do pH e das concentrações de amônio no solo pode ter contribuído para a maior diversidade de bactérias nitrificadoras nos solos sob cobertura de gramíneas, em relação à floresta nativa. Entretanto a presença dessas bactérias não resultou em aumentos do teor de NO_3^- no solo, devido à sua imediata imobilização pela biomassa microbiana.

Palavras-chave: Amazônia, Solo, Carbono, Nitrogênio, NH_4^+ , NO_3^- , PCR-DGGE, *Bacteria*, AOB, NOB, Sequenciamento.

ABSTRACT

Bacterial diversity in Amazonian soils: variability of the genera associated to the nitrification process

Amazonian tropical forest soils are supposed to hold high microbial biodiversity, since they support by litter recycling one of the most luxuriant ecosystems. However, anthropogenic practices of slash and burn, mainly for pasture establishment, induce deep changes in the biogeochemical cycles, mainly of nitrogen. Such changes become noticeable by the predominance of distinct forms of mineral N. While in forest soils NO_3^- content is higher or equal to NH_4^+ , in pasture soils NO_3^- is hardly found. Degraded pastures are usually abandoned and turn to a secondary vegetation or “capoeira”. These land-use changes may direct the predominance of specific groups of soil microorganisms, or yet induce significant losses of microbial diversity. To evaluate the extent of microbial community disturbance we analyzed samples from the upper 0-10 cm soil layer from a forest, an effectively grazed pasture and a fallow site, located in the southwest Amazonian Region. Total organic and microbial C and N, mineral N, net mineralization and nitrification rates, as well as *Bacteria* diversity by PCR-DGGE and AOB, NOB diversity by sequencing the 16S ribosomal region were measured twice, during the rainy (February) and dry (September) seasons 2004.

Results showed that this well managed pasture site contained 30 to 42% more organic C than the capoeira and 47% more than the forest site over the year. The same pattern was observed for total N. Microbial biomass C and N in pasture soil were about 38 and 26%, respectively, higher than in fallow and forest sites during the rainy season. However, the shortage of humidity during the dry season affected the pasture microbial biomass more intensively. Corg:Cmicr and Norg:Nmicr ratios were also sharply reduced in this period, indicating improper conditions for substrate utilization. Nitrate concentration was highest in forest soil, while ammonium was the predominant form of mineral N in the pasture and capoeira sites. The highest mineralization and nitrification rates were determined in the forest soils during the wet season, while the other systems showed negative or very low values.

The molecular approach by PCR-DGGE revealed that the structure of microbial communities of *Bacteria* Domain was different among the types of land use. The main reason for these variations is possibly related to the associated effect of land cover and chemical soil characteristics. The diversity of nitrifying bacteria, evaluated by ribosomal 16S region sequencing, was greater in the pasture and capoeira than in the forest soil. AOB 16S rDNA sequences showed more similarity to *Nitrosospira* sp., *Nitrosospira multiformis*, *Nitrosospira briensis*, *Nitrosospira tenuis*, *Nitrosovibrio* sp., *Nitrosovibrio tenuis* and *Nitrosolobus multiformis* species. The diversity of NOB group followed the same pattern of greater diversity after land use change to pastures. Clone sequences found in forest soil were closely related only to *Nitrobacter* sp., while pasture soil had clone sequences similar to *Nitrobacter* sp., *Nitrobacter winogradsky*, *Nitrobacter alkalicus*, *Nitrobacter hamburgensis* and *Nitrobacter vulgaris*. NOB diversity in capoeira soil was lower. Only *Nitrobacter* sp. and *Nitrobacter hamburgensis* were present. Higher pH and NH_4^+ concentrations may have contributed to greater diversity of nitrifying bacteria in the soils under grass cover compared to the forest site. However, the presence of these bacteria did not raise the soil NO_3^- contents, due to its fast immobilization by microbial biomass.

Key-words: Amazonian, Soil, Carbon, Nitrogen, NH_4^+ , NO_3^- , PCR-DGGE, *Bacteria*, AOB, NOB, Sequencing.

1 INTRODUÇÃO

A Bacia Amazônica abrange praticamente 25% do continente Sul Americano. Com cerca de 7,5 milhões de km², estende-se pelo território de nove países e concentra 70% das florestas tropicais do globo. Somente no Brasil são 5,1 milhões de km². Apesar de sua grande beleza e exuberância, a Floresta Amazônica encontra-se sobre solos de baixa fertilidade, estando sua manutenção dependente da ciclagem dos nutrientes contidos na fitomassa. Nesse contexto, destaca-se a importância da biomassa microbiana, responsável pela degradação dos materiais orgânicos, cujos produtos serão absorvidos pelas raízes de plantas.

Um solo que apresenta alta redundância de funções no ecossistema é capaz de manter em equilíbrio os processos ecológicos, mesmo sob um distúrbio. Essa abordagem, definida como resiliência, refere-se ao tamponamento dos efeitos de distúrbios externos ao ecossistema. Esse tamponamento depende diretamente da biodiversidade e das interações entre os processos ecológicos. No solo, a redução da diversidade microbiana pode ser um importante indicador da perda de resiliência e, por consequência, da qualidade do solo. A abundância de algumas espécies de microrganismos parece não ser tão importante quanto a manutenção da diversidade, visto que a abundância reflete de forma mais imediata a flutuação microbiana de curto prazo, enquanto a diversidade revela o equilíbrio entre os organismos e os domínios funcionais no solo (KENNEDY, 1999; LAVELLE, 2000).

Devido a sua grande extensão e baixa densidade populacional, a Amazônia ainda é o bioma brasileiro mais bem conservado, com 85% de suas florestas primárias intactas (INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS, 2006). Entretanto, o impacto antrópico foi extenso nas últimas décadas, associado à retirada não controlada de madeira e ao avanço concomitante da fronteira agrícola. É notória a importância da Amazônia para o ecossistema brasileiro e até mundial. Justamente devido a isso, as imagens das derrubadas e queimadas da floresta produzem forte impacto na opinião pública. São mais de 60 milhões de hectares desmatados. Desse total, estima-se que 35 milhões tenham sido transformados em pastagens, um milhão foi ocupado com plantas perenes, três milhões com cultivos anuais e mais de 20 milhões suportam

vegetação secundária denominada capoeira. A taxa média de desmatamento entre agosto de 2005 a agosto de 2006 foi estimada em 13.100 km² (INPE, 2006).

O principal uso das áreas desmatadas consiste no plantio de pastagens para a pecuária. Esta drástica mudança de uso da terra resulta em profundas alterações dos ciclos biogeoquímicos. No que se referem ao ciclo do nitrogênio, diversos estudos mostraram a predominância de formas diferentes de N mineral, ou seja, no solo sob floresta o teor de NO₃⁻ é igual ou maior que o de NH₄⁺, enquanto que sob pastagem encontra-se quase que exclusivamente NH₄⁺. A nitrificação litotrófica, processo de transformação seqüencial de NH₄⁺ via NO₂⁻ para NO₃⁻, é catalisado por dois grupos filogeneticamente distintos de bactérias da família Nitrobacteriaceae: as oxidadoras de amônio (internacionalmente denominadas AOB) e as oxidadoras de nitrito (internacionalmente denominadas NOB). Em hipótese, a mudança no uso da terra pode direcionar a predominância de grupos específicos de bactérias associadas à nitrificação nos diferentes sistemas, ou ainda, ocasionar perdas significativas na diversidade dos microrganismos como um todo. Foi suposto também que o crescimento da capoeira restabeleça parte dessa biodiversidade.

O objetivo geral desta pesquisa foi avaliar o impacto do desmatamento na diversidade das espécies de bactérias nitrificadoras do solo. Para tanto, foram analisadas as seguintes variáveis nos sistemas alterados em relação ao sistema nativo:

- Carbono e o nitrogênio total do solo e fração imobilizada na biomassa microbiana;
- Formas de nitrogênio mineral (amônio e nitrato) e taxas de mineralização e nitrificação;
- Diversidade geral do Domínio *Bactéria*;
- Diversidade de bactérias oxidadoras de amônio e de bactérias oxidadoras de nitrito.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão de literatura

2.1.1 A floresta tropical e a mudança no uso da terra

A Amazônia é formada pela Bacia do Rio Amazonas e recoberta pela maior floresta equatorial do mundo, abrangendo 6.915.000 km² de área, dos quais 4.787.000 km² estão no Brasil. Geograficamente, compreende a região que vai de Pongo Manseriche (Peru) ao norte do Maranhão, em longitude, e do Delta do Orinoco (Venezuela) ao norte do Mato Grosso, em latitude. Mas há, pelo menos, duas outras classificações. Uma é a da Amazônia como região norte do Brasil, compreendendo seis Estados: Amazonas, Pará, Amapá, Roraima, Acre e Rondônia; outra é a denominada Amazônia Legal, criada em 1966, a qual inclui ainda a maior parte do Maranhão, o norte de Mato Grosso e o Estado de Tocantins (FEARNSIDE, 2005).

Até a década de 60 podia-se dizer que a ação do homem sobre a cobertura florestal da Amazônia era insignificante. A partir dos anos 70, com a implantação de programas de desenvolvimento pelo Governo Federal, iniciou-se o desmatamento de forma acelerada, prosseguindo nas décadas subseqüentes. Quando se fala em desmatamento da Amazônia, refere-se à perda da floresta original que, antes da chegada dos europeus, cobria quatro dos cinco milhões de km² da área que hoje é chamada Amazônia Legal. Até o ano de 1994, a área desflorestada foi estimada em 517.10² km², dos quais aproximadamente 45% foram convertidos em pastagens (FEARNSIDE; BARBOSA, 1998). Em 2003, o desmatamento alcançou 649.10³ km², ou seja, 16,2% da área total da Amazônia brasileira. A taxa média de desmatamento entre agosto de 2005 a agosto de 2006 foi estimada em 13.10² km² (INPE, 2006) (Figura 1). Embora áreas extensas ainda permaneçam intactas, a taxa de perda da floresta é dramática, em especial no “arco do desmatamento”, ao longo das bordas sul e leste (FEARNSIDE, 2005).

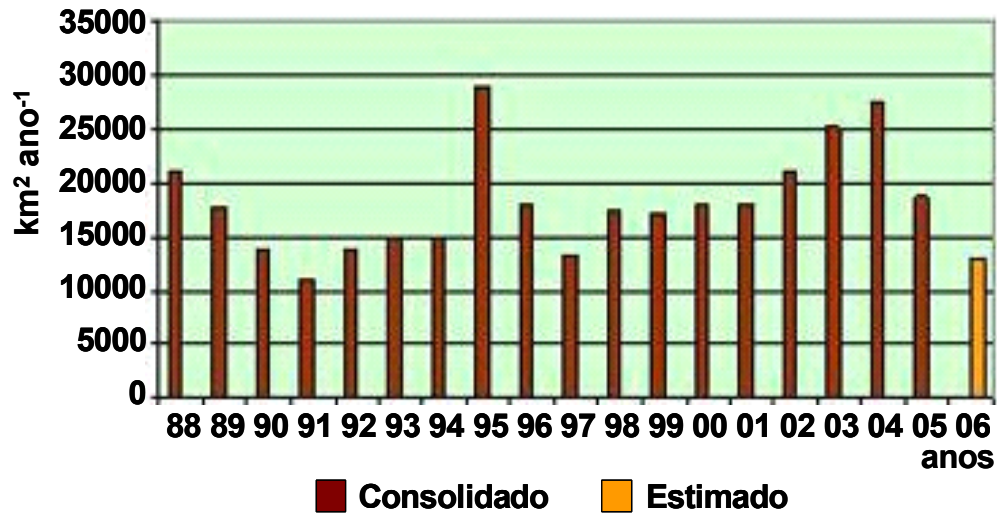


Figura 1 - Taxa de desmatamento anual na Amazônia Legal brasileira. Fonte: Adaptado do INPE (2006)

Espécies de gramíneas trazidas do continente africano foram utilizadas na implantação de pastagens para a criação de gado de corte e leiteiro no Brasil. A primeira espécie testada foi a *Panicum maximum*, conhecida como capim-colonião, que atualmente cobre áreas extensas de terras degradadas nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e também na Amazônia. No início dos Anos 70, a gramínea *Brachiaria decumbens* foi trazida da Austrália, coincidindo com o período de expansão da fronteira agrícola pelas regiões central e norte do Brasil (BODDEY et al., 2004). Nos últimos 30 anos, outras espécies do gênero *Brachiaria* foram introduzidas em, pelo menos, 20 milhões de hectares da região amazônica (VEIGA, 1995). De um modo geral, a implantação das pastagens é feita com pouca tecnologia e sem a aplicação de nenhuma forma de fertilizante. Sua manutenção dependente quase que exclusivamente dos nutrientes contidos nas cinzas produzidas durante a queima da vegetação original.

O que vem acontecendo nas áreas de pastagens em diversos locais na Amazônia (VEIGA, 1995), assim como em outras regiões tropicais (MYERS; ROBBINS, 1991; ROBBINS et al., 1989) é a perda da capacidade produtiva após 4 a 10 anos de uso, dando início ao processo de degradação (SERRÃO et al., 1982; SERRÃO; HOMMA, 1982; SOUZA FILHO et al., 1991; VEIGA, 1995). Estima-se que 30 a 50% das pastagens da Amazônia Brasileira estejam em estágio avançado de degradação

(FEARNSIDE, 2005). Conhecida como capoeira, a vegetação secundária que se desenvolve gradativamente nestas áreas tem a capacidade de repor nutrientes ao solo além de assimilar parte do carbono que foi liberado durante o corte e queima da floresta original (SCHROTH et al., 2002; ZARIN et al., 2001).

Dentre os vários fatores que influenciam a perda da capacidade produtiva das pastagens citam-se a baixa disponibilidade de fósforo (FERNANDES, 1999) e de nitrogênio no solo (NEILL et al., 1995; NEILL et al., 1999), o excesso de animais e o estabelecimento de plantas invasoras (VEIGA, 1995). Segundo Toledo e Navas (1986), mais de 10 milhões de hectares de pastagens na Amazônia brasileira apresentam níveis de infestação por invasoras acima de 70%, caracterizando um elevado grau de degradação.

2.1.2 O ciclo do nitrogênio

O nitrogênio é elemento indispensável para os seres vivos, pois faz parte das moléculas de aminoácidos, proteínas e ácidos nucléicos. Embora esteja presente em grande quantidade no ar na forma molecular (N_2), poucos seres vivos o assimilam nessa forma. Apenas algumas bactérias conseguem captar o N_2 , utilizando-o na síntese de moléculas orgânicas nitrogenadas. Os microorganismos fixadores de nitrogênio, quando morrem, liberam no ambiente o nitrogênio na forma orgânica. O processo de oxidação dessas substâncias fornece energia aos grupos de bactérias responsáveis pelos processos da amonificação e nitrificação. A Figura 2 ilustra resumidamente as principais etapas do ciclo do nitrogênio no solo.

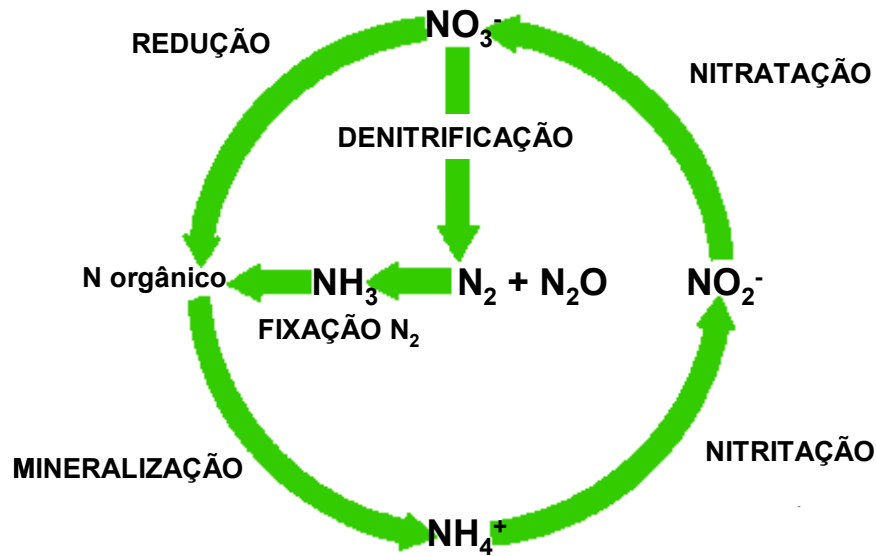


Figura 2 – Principais processos do ciclo do nitrogênio no solo

Estudos intensivos das alterações das características do solo após a derrubada da floresta e implantação de pastagens na Fazenda Nova Vida, situada no Estado de Rondônia, (PICCOLO et al., 1994; FEIGL et al., 1995 a,b,c; MORAES et al., 1995; NEILL et al., 1995; MORAES et al., 1996; STEUDLER et al., 1996; NEILL et al., 1997 a,b; GARCIA-MONTIEL et al., 2000; GARCIA-MONTIEL et al., 2001; CERRI et al., 2003; CERRI et al., 2004; CERRI et al., 2005) levantaram uma série de questões sobre a origem das alterações observadas na ciclagem de nutrientes. O solo sob floresta normalmente tem maior estoque de nitrogênio mineral extraível do que a pastagem (PICCOLO et al., 1994; NEILL et al., 1995; NEILL et al., 1996). Na floresta o teor de NO_3^- é semelhante ou maior que o de NH_4^+ , enquanto na pastagem os teores de N mineral consistem quase que exclusivamente de NH_4^+ . Taxas líquidas de mineralização de N e de nitrificação são maiores na floresta do que na pastagem, embora não tenham sido observadas diferenças entre pastagens de diferentes idades. Taxas de nitrificação líquida elevadas foram encontradas em solos sob floresta, sugerindo haver perda potencial de NO_3^- por lixiviação e/ou por via gasosa na forma de NO, N_2O , NO_x e outras (ROBERTSON; TIEDJE, 1988; NEILL et al. 1995; GARCIA-MONTIEL et al. 2001).

2.1.3 Biomassa microbiana e a especificidade das funções

A qualidade e a fertilidade de um solo são definidas como a combinação das propriedades químicas, físicas e biológicas que contribuem decisivamente para o funcionamento do mesmo (DILLY; NANNIPIERI, 2001). Cinco atributos são considerados essenciais para a manutenção da produtividade agrícola, a saber: a capacidade do solo em promover o crescimento das raízes de plantas, o suprimento de água e a transformação de nutrientes, a troca eficiente de gases na interface solo-atmosfera e a promoção da atividade dos macros e microrganismos do solo (KELTING et al., 1999). Nesse âmbito destaca-se o papel da biomassa microbiana do solo (BMS), definida como a parte viva da matéria orgânica, excluindo-se raízes e organismos maiores que, aproximadamente, $5000 \mu\text{m}^3$ (WARDLE, 1992). A BMS compreende os organismos dormentes e os metabolicamente ativos no solo. Possui papel fundamental na manutenção e produtividade dos ecossistemas por sua habilidade de transformar os materiais orgânicos, cujos produtos serão posteriormente absorvidos pelas raízes de plantas (MARCHIÓRI JÚNIOR; MELO, 1999).

A BMS é considerada indicadora da qualidade, ou mesmo da “saúde” do solo, visto ser uma das poucas frações da matéria orgânica biologicamente ativa, sensível a manejos e a poluição e que pode ser quantificada (SCHROTH et al., 2002). O desenvolvimento de métodos indiretos de medida da BMS como a fumigação-incubação (FI) (JENKINSON; POWLSON, 1976), a respiração induzida do substrato (SIR) (ANDERSON; DOMSCH, 1978), o teor de ATP nas células microbianas (JENKINSON; LADD, 1981) e a fumigação-extração (VANCE et al., 1987) facilitaram o acesso a esse compartimento da MOS. Diversos estudos quantificaram os principais elementos imobilizados nas células microbianas em diferentes horizontes do solo.

Modificações na BMS têm sido detectadas em função das diversas práticas de manejo e uso do solo. Cultivos por longo tempo promovem alterações devido a mudanças na porosidade do solo, aumentos da temperatura em certas épocas do ano etc., mas um novo equilíbrio é atingido após as flutuações iniciais (MARCHIÓRI JÚNIOR; MELO, 1999). Dentre os vários sistemas de cultivo, a rotação de culturas aumenta consideravelmente a BMS pela liberação de diferentes composições de ácidos

orgânicos, componentes dos exsudatos radiculares das plantas, resultando assim em um maior número de espécies microbianas habitando o solo, em comparação com o sistema de monoculturas (ALVAREZ et al., 1995). Pode-se citar ainda a profundidade como decisiva no desenvolvimento da BMS, a qual se concentra em sua maior parte na camada superficial (0–10 cm) do solo (FRANZLUEBBERS et al., 1995).

De maneira geral, a BMS reflete o teor de matéria orgânica total, representando um parâmetro eficiente e sensível na avaliação da qualidade dos solos submetidos a diferentes tipos de manejo ou a impactos de poluição (INSAM, 2001). No Brasil, estudos realizados na Amazônia em cronosequência floresta/pastagem têm demonstrado que a biomassa microbiana do solo sofre redução nos primeiros anos (cerca de três a cinco anos), mas aumenta nas pastagens mais velhas, podendo alcançar níveis semelhantes aos da floresta nativa (GERALDES et al., 1995; FERNANDES, 1999). Apesar de sua importância, ainda são escassos os estudos que enfocam o efeito do desmatamento e introdução de pastagens na biomassa microbiana em solos da Amazônia, além de cada um deles adotar uma metodologia distinta para as diversas condições dos solos tropicais (FEIGL et al 1995 a,b).

A capacidade de a BMS voltar a aumentar nas pastagens mais velhas, alcançando valores próximos aos da floresta nativa, sugere que a microbiota desses solos apresenta elevada resiliência, ou seja, capacidade de crescimento e de atividade fisiológica, mesmo após o impacto do corte e queima da floresta. A estabilidade de um sistema determina sua habilidade em continuar funcionando sob condições de estresse, tanto os naturais como aqueles induzidos por ação antrópica (ORWIN; WARDLE, 2004). Pelo fato dos microrganismos serem os mediadores das reações de transformação da matéria orgânica e da disponibilidade de nutrientes, sua resiliência afeta diretamente a produtividade das plantas e a estabilidade dos ecossistemas florestais e agrícolas (ORWIN; WARDLE, 2005). Por essa razão é essencial entender como os microrganismos respondem aos distúrbios ambientais, bem como os fatores envolvidos nessa resposta (ORWIN et al., 2006).

As mudanças sazonais de umidade e temperatura promovem oscilações na BMS, afetando também as taxas de mineralização e imobilização dos nutrientes e os fluxos de gases na interface solo-atmosfera. Fernandes et al., (2002) observaram maior

taxa de respiração microbiana e produção de metano na estação chuvosa, nas áreas de floresta e pastagem da Fazenda Nova Vida, em Rondônia. Bijayalaxmi Devi e Yadava (2006) também reportaram os valores máximos de C, N e P microbianos durante a estação das chuvas, em uma floresta subtropical secundária em Manipur, região nordeste da Índia. Orwin e Wardle (2005) testaram a resistência e resiliência da BMS ao efeito de diferentes tipos de plantas e a distúrbios de secagem e umedecimento do solo, simulando variações sazonais. Foram plantadas espécies de gramíneas de pastagem (*Trifolium repens*, *Lolium perenne* e *Plantago lanceolata*) em monocultivo e associadas, juntamente com amostras de solo sem plantas, utilizadas como controle, para avaliar se a composição botânica e/ou a riqueza de espécies afetariam as propriedades químicas do solo, e conseqüentemente a comunidade de microrganismos. As parcelas onde as espécies de gramíneas estavam associadas não influenciaram diretamente as propriedades químicas do solo e nem a comunidade microbiana em geral. Entretanto, observou-se que as amostras de solo cobertas por *T. repens* induziram maior resistência e resiliência microbianas aos distúrbios da seca, do que as amostras de solo com *P. lanceolata* e maior resistência do que nos solos com *L. perenne*. As diferenças de resistência e resiliência dos solos aos tratamentos podem estar relacionadas ao fato de alguns serem limitados pelo C e outros pelo N. A quantidade de N mineral nos solos cobertos por *T. repens* e *L. perenne* indicam que a BMS é mais limitada pelo C, portanto mais resiliente e resistente do que a BMS dos solos cobertos com *P. Lanceolata*, onde o N é limitante.

A abordagem funcional da BMS é um aspecto importante utilizado atualmente para se descrever o impacto do manejo do solo e dos fatores ambientais sobre a abundância e a diversidade relativa de grupos microbianos como bactérias, fungos, actinomicetos, celulolíticos, amonificadores, nitrificadores, dentre outros. Sabe-se que a definição de espécies microbianas é complexa, porém há atualmente uma série de métodos que se baseiam em medidas de resposta dos microrganismos a diferentes tipos de substratos orgânicos. O método Biolog detecta reações microbianas de catabolismo por meio da mudança de cor em uma suspensão de solo contendo uma fonte de carbono solúvel. Uma limitação do método é que apenas os microrganismos cultiváveis e hábeis em crescer em condições de alta concentração de nutrientes serão

capazes de utilizar o substrato (CHEN et al., 2007). Por sua vez, o perfil de resposta catabólica (CRP) avalia a resposta respiratória dos microrganismos à adição de compostos orgânicos individuais ao solo. O CRP permite a avaliação da diversidade funcional da microbiota do solo, em resposta a mudanças do uso da terra, intensidade de manejo agrícola bem como ao estado da matéria orgânica do solo. Uma resposta maior de uso de um determinado substrato orgânico pelos microrganismos forneceria informações se a microbiota de um determinado solo está mais adaptada fisiologicamente para utilizar certo substrato orgânico (DEGENS et al., 2000; STEVENSON et al., 2004).

Entretanto a quantificação da biomassa microbiana não permite a diferenciação da diversidade de microrganismos presentes em amostras ambientais. O avanço da utilização de técnicas moleculares em ecologia microbiana tem mostrado que, na verdade, uma fração ínfima da diversidade dos microrganismos é conhecida (SCHLOTTER et al., 2003).

2.1.4 Abordagem molecular da diversidade microbiana

A biodiversidade em um ecossistema é definida a partir de dois componentes: o número total de espécies presentes e a distribuição dos indivíduos entre as espécies (KENNEDY; SMITH, 1995). No caso da comunidade microbiana do solo, estudos sobre diversidade são complexos, devido às dificuldades de identificação das espécies, bem como de isolamento de microrganismos que se encontram, freqüentemente, ligados aos minerais do solo e/ou à matéria orgânica (PAUL; CLARK, 1989).

Diversidade é um conceito importante em ecologia, amplamente utilizado no monitoramento e preservação das espécies no ambiente. A elevada diversidade microbiana no solo está diretamente relacionada à resistência do sistema a estresses e condições extremas de temperatura (ALVAREZ et al., 1995), metais pesados (LEITA et al., 1995; KANDELER et al., 2000) e sais (CRITTER; AIROLDI, 1996), além das práticas de desmatamento de florestas e queimadas (GERALDES et al., 1995). O índice de diversidade pode ser utilizado como parâmetro sensível para avaliar os estresses do ambiente sobre a microbiota. Entretanto a diversidade de espécies microbianas em

qualquer solo está também associada à redundância de funções. Andrén et al., 1995 estudando a decomposição de material orgânico associada à diversidade de espécies, não encontraram informações de que as taxas de decomposição no solo sejam controladas pela diversidade de espécies microbianas. Em um experimento controlado, Degens, 1998a observou que a fumigação do solo não reduziu as taxas de decomposição de palhada no solo.

Embora a diversidade de microrganismos no solo seja imensa (TORSVIK et al., 1990; HEDRICK et al., 2000), somente uma porcentagem muito baixa (cerca de 1 %) de microrganismos é cultivável (BORNEMAN; TRIPLETT, 1997; GELSOMINO et al., 1999). As espécies bacterianas, por exemplo, não são distinguíveis por técnicas de microscopia, devido à limitada variedade morfológica entre as espécies. Adicionalmente, os métodos de obtenção de bactérias em meios de cultura são pouco efetivos para sua quantificação, devido às dificuldades em se reproduzir as condições que uma espécie ou grupos específicos requerem em seus habitats naturais (FELSKE; AKKERMANS, 1998).

Em contrapartida, os métodos moleculares permitem maior conhecimento das populações microbianas não cultiváveis. A utilização desses métodos possibilita a compreensão da diversidade filogenética entre os microrganismos e dos efeitos de impactos ambientais sobre estes (GARCÍA-MARTÍNEZ et al., 1999; WATANABE et al., 2001).

2.1.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante

Eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE) e eletroforese em gel de gradiente de temperatura (TGGE) têm sido aplicadas em estudos de ecologia microbiana para analisar a diversidade e a dinâmica de populações microbianas no ambiente (MUYZER; RAMSING, 1995). Após a extração, o DNA é purificado e um fragmento específico é amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

A extração de DNA total do solo pode ser feita por meio de duas técnicas distintas: as células são extraídas por sucessivas centrifugações, e lisadas para a coleta

do DNA, ou o DNA é extraído diretamente do solo. Courtois et al., 2001 mostraram que as quantidades de DNA extraídas diretamente do solo são bem maiores pelo método direto ($38-93 \mu\text{g.g}^{-1}$ solo seco) do que pelo indireto ($0.4 \mu\text{g.g}^{-1}$ solo seco). Outro fator importante é que o processo contínuo de centrifugações pode inibir a reação de PCR devido à interferência dos ácidos húmicos sobre a taq DNA polimerase (INSAM, 2001).

Os produtos da amplificação são analisados em gel de eletroforese, o qual permite a separação dos amplicons de acordo com seus teores de G+C (MUYZER et al., 1993). Genes com teores distintos de G+C formam diferentes padrões de bandas, característicos de cada comunidade. Se outras informações forem necessárias, as bandas podem ser extraídas, clonadas, seqüenciadas e essas seqüências comparadas com seqüências depositadas em bancos de dados. Os estudos ainda mostram que muitas das seqüências detectadas não apresentam homologia com seqüências de organismos conhecidos, representando, dessa forma, espécies novas (SCHWIEGER; TEBBE, 1998).

A comparação de seqüências é importante também para a construção de sondas de oligonucleotídeos para detecção *in situ* de espécies particulares (MUYZER; RAMSING, 1995). A técnica DGGE de fragmentos rDNA 16S amplificados por PCR tem sido aplicada em estudos comparativos da diversidade de bactérias em solos (GELSOMINO et al., 1999; HEDRICK et al., 2000), em amostras de águas contaminadas (WATANABE et al., 2001), na resposta da comunidade microbiana ao efeito de enriquecimento de exsudatos de raízes em solos contendo diferentes níveis de metais pesados (KOZDRÓJ; VAN ELSAS, 2001), bem como no estudo da variação na diversidade de *Archaea* em solos tratados durante longo tempo com lodo de esgoto contendo diferentes quantidades de metais pesados (SANDAA et al., 1999).

Seghers et al. (2003) investigaram o efeito crônico da aplicação dos herbicidas atrazina e metolaclor na estrutura, abundância e função de grupos de bactérias em solo cultivado com milho durante 20 anos por PCR-DGGE. A análise de grupamento dos padrões de DGGE obteve diferenciou os solos tratados e não tratados com os herbicidas, sugerindo que mudanças ocorreram na estrutura da comunidade do solo, ainda que a função da comunidade tenha sido preservada.

Wheatley et al. (2003) analisaram as taxas potenciais de nitrificação (PNRs), comparando as estruturas de comunidades de *Bacteria* com os subcomponentes e a dinâmica das populações de nitrificadores, dentro e entre três áreas agrícolas por meio da análise PCR-DGGE. Os resultados mostraram que as PNRs foram significativamente diferentes entre as três áreas, e que a diversidade de *Bacteria* também apresentou diferenças temporais de acordo com a estação climática dentro de cada área de cultivo. Em compensação, a análise PCR-DGGE específica para os nitrificadores sugeriu que a diversidade de organismos nessa população foi similar e não variou com a estação climática. Ainda a avaliação quantitativa por PCR competitivo mostrou que houve diferenças quantitativas na população de nitrificadores entre as áreas, mas dentro de cada área as populações permaneceram estáveis ao longo do tempo.

De um modo geral, o uso intensivo das pastagens acelera a ciclagem do nitrogênio (PATRA et al., 2005). O que não se sabe ao certo é se essa atividade afeta também a quantidade e a estrutura genética de grupos funcionais microbianos associados ao ciclo do nitrogênio no solo. Patra et al., 2007 compararam duas pastagens de diferentes intensidades de manejo quanto à presença de microrganismos nitrificadores, desnitrificadores e fixadores de N_2 de vida livre no solo por PCR-DGGE, bem como a atividade de enzimas específicas do ciclo da nitrificação. Os resultados indicaram que a produção dessas enzimas e o número de nitrificadores e desnitrificadores foram maiores na pastagem de uso mais intenso. A estrutura genética dos grupos microbianos avaliados diferiu entre os sistemas de manejo. As diferenças na atividade enzimática dos microrganismos se correlacionaram com mudanças na ocorrência de fragmentos de DNA específicos. Os autores concluíram que o uso mais intensivo de pastagens estimulou a atividade microbiana induzindo, como consequência, mudanças na composição genética dessas comunidades no solo.

Clegg 2006 avaliou o efeito do pastejo do gado e da aplicação de fertilizante nitrogenado ao solo sobre a estrutura de grupos específicos de eubactérias, *Pseudomonas*, actinomicetos e fungos por PCR-DGGE. A presença do gado afetou significativamente apenas a comunidade de *Pseudomonas*, enquanto que o fertilizante nitrogenado promoveu efeitos na estrutura das comunidades de eubactérias,

Pseudomonas e actinomicetos. Nenhum dos tratamentos testados alterou a comunidade de fungos. O efeito desses fatores sobre a composição de grupos específicos de microrganismos pode influenciar diretamente a dinâmica da ciclagem dos nutrientes no solo.

Nogueira et al., 2006 testaram atributos químicos e microbiológicos relacionados aos ciclos do C e N, juntamente com a análise molecular da diversidade bacteriana por PCR-DGGE, para avaliar a significância destes como indicadores de qualidade de solo em uma floresta subtropical, comparando-a com áreas reflorestadas e sob manejo agrícola. As áreas sob floresta nativa e reflorestada apresentaram maior atividade microbiológica e diversidade de bactérias, contrastando com aquelas sob cultivo agrícola. Os padrões de agrupamento das áreas de estudo foram similares para ambos os parâmetros microbiológicos e moleculares, indicando que medidas como biomassa e diversidade microbiana podem ser utilizadas como indicadores de qualidade de solo em diferentes sistemas de manejo e uso da terra.

2.1.6 Bactérias nitrificadoras em solos da Amazônia

Estudos da diversidade microbiana em solos freqüentemente enfocam as mudanças na estrutura da comunidade após situações de estresse ou alterações de manejo, porém poucos são os trabalhos abrangendo um grupo funcional específico. Entretanto, a análise da heterogeneidade espacial dos microrganismos no solo pode ser mais bem compreendida por meio do monitoramento de um grupo específico de microrganismos.

A nitrificação litotrófica ocorre em duas etapas distintas: a conversão do amônio em nitrito, e sua subsequente conversão em nitrato. Essas duas etapas são realizadas pelas bactérias oxidadoras de amônio (AOB) e as oxidadoras de nitrito (NOB), respectivamente. A energia liberada durante a oxidação de compostos inorgânicos pode ser utilizada por esses organismos como fonte de energia para o crescimento. A nitrificação no solo é restrita a um grupo limitado de gêneros de bactérias (DE BOER; KOWALCHUK, 2001). As bactérias AOB possuem importância ambiental por desempenharem papel essencial na ciclagem global do nitrogênio, bem como são

responsáveis pela primeira e, frequentemente, etapa limitante do processo de nitrificação. Por essa razão, bem como por certas dificuldades metodológicas, essas bactérias têm sido mais intensamente estudadas do que as NOB nos últimos anos (KOWALCHUK et al., 1997).

Análises com o 16S rDNA têm mostrado que as AOB estão relacionadas a duas linhagens filogenéticas distintas (Figura 3). A maioria dessas linhagens pertence a um grupo monofilético da subclasse- β de *Proteobacteria*, a qual inclui os gêneros *Nitrosomonas* e *Nitrospira* (NUGROHO et al., 2007). Bactérias representantes das NOB estão presentes também em grupamentos filogenéticos. Os gêneros conhecidos que contêm exclusivamente NOB quimiolitotróficas são *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospina* e *Nitrospira*. Desses, apenas *Nitrobacter* tem sido detectado em solos (MALHAUTIER et al., 1998; SCHRAMM et al., 1998) de maneira que a distribuição de outros gêneros NOB necessita ser mais bem investigada. Considerando-se que a nitrificação é o processo aeróbico central da ciclagem microbiana do nitrogênio, o conhecimento da diversidade desses organismos poderia auxiliar em um melhor controle desse processo, promovendo aumentos na produtividade vegetal com menores riscos de perdas de NO_3^- por lixiviação e, conseqüentemente, contaminação de lençóis freáticos (DEGRANGE; BARDIN, 1995; BALL-COELHO et al., 2004; VENTEREA et al., 2004).

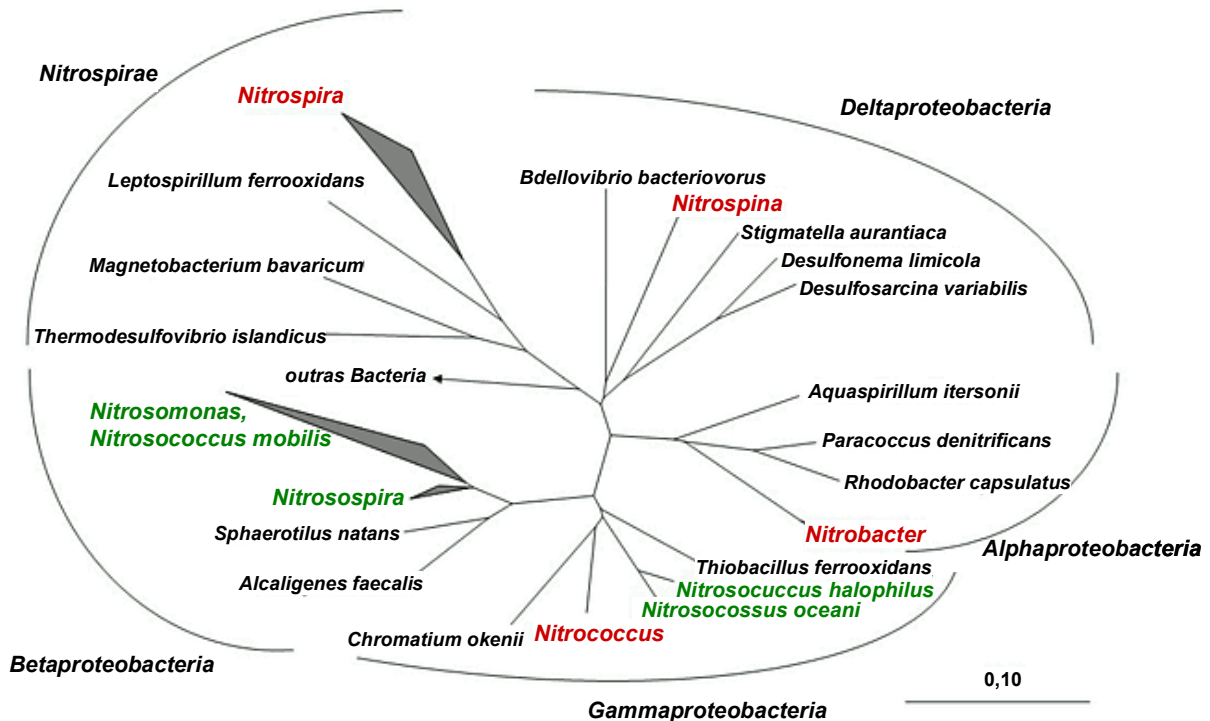


Figura 3 - Árvore filogenética baseada no 16S rRNA mostrando a afiliação das bactérias oxidadoras de amônio (verde) e as oxidadoras de nitrito (vermelho). Adaptado de <http://www.microbial-ecology.net/nitrifiers.asp>

Apesar das bactérias AOB desempenharem papel essencial na etapa inicial do processo de nitrificação, o qual determina em parte o destino do nitrogênio no solo, ainda não se sabe como os fatores abióticos afetam a diversidade e/ou composição dessas bactérias, especialmente em solos tropicais. Carney et al. (2004) avaliaram como a diversidade de plantas e as mudanças no uso da terra influenciaram a diversidade de AOB em solos da Costa Rica. Os resultados obtidos mostraram que a diversidade não mudou entre as diferentes plantas testadas, mas foi significativamente diferente na conversão de floresta em pastagem, correlacionando-se positivamente com as taxas de nitrificação. Os autores detectaram a predominância de espécies do gênero *Nitrosospira*, mas uma maior proporção de *Nitrosomonas* em solos com cobertura de pastagem, sugerindo que este grupo pode se tornar dominante em sistemas mais ricos em nutrientes. Dentre os principais fatores abióticos de influência direta na diversidade das AOB no solo citam-se a taxa de mineralização do nitrogênio, a umidade do solo, o

pH e o teor de amônio (AVRAHAMI et al., 2002). A presença de espécies raras de AOB é um fator biótico importante para explicar as diferenças entre as áreas amostradas. Dessa forma, a ação antrópica sobre os ecossistemas promove alterações nas comunidades microbianas, afetando diretamente os processos por elas mediados.

Diversos estudos abordaram o metabolismo, meio de sobrevivência e crescimento dos oxidadores de nitrito (NOB) em ambientes submetidos à presença de substâncias poluidoras (FÉRAY; MONTUELLE, 2002; FÉRAY; MONTUELLE, 2003; LÓPES-FIUZA et al., 2002), porém poucos examinaram populações naturais de *Nitrobacter* no solo. Embora a conversão biológica de nitrito em nitrato seja um processo bem conhecido, estudos de populações de *Nitrobacter* ficam prejudicados pelos métodos inadequados de detecção e contagem. Os métodos tradicionais fornecem informações pouco precisas da diversidade dos organismos envolvidos na reação, pois os representantes do gênero apresentam crescimento lento em meio de cultura, pequena biomassa e susceptibilidade à contaminação (DEGRANGE; BARDIN, 1995). Em contrapartida, a análise molecular do rDNA 16S permite a detecção e a quantificação das populações naturais de nitrificadores no solo em estudos de diversidade funcional (MALHAUTIER et al., 1998; GRUNDMANN; NORMAND, 2000).

A espécie *Nitrobacter* sp. é a mais bem investigada dentre as oxidadoras de nitrito. O DNA é extraído do solo e amplificado utilizando-se primers específicos durante a reação de PCR. Sondas de oligonucleotídeos são usadas em hibridizações quantitativas (SCHRAMM et al., 1998). Estudos da diversidade do gênero *Nitrobacter* por distâncias genéticas obtidas por ARDRA em diversas escalas espaciais como microamostras de solo, blocos, campo e áreas geográficas indicaram que a diversidade de espécies é tão elevada pequenas como em grandes escalas. Um grama de solo pode representar a diversidade de *Nitrobacter* de uma ampla área de pradaria homogênea (GRUNDMANN; NORMAND, 2000).

Poucos estudos têm examinado as populações microbianas de solos da região Amazônica. Manfio e Goodfellow (1995) e Linhares (1995) estudaram estirpes de *Streptomyces* isoladas de solos de floresta. Este estudo foi conduzido utilizando-se técnicas moleculares de isolamento, seguidas da caracterização das estirpes. Borneman e Triplett (1997) realizaram uma primeira descrição da biodiversidade

microbiana sob a perspectiva da análise molecular do DNA total em solos amazônicos sob floresta e pastagem. Foi detectada a presença de 18% de seqüências que não pertenceram a nenhum gênero bacteriano conhecido. Os padrões de formação de bandas se mostraram distintos em cada local, indicando que cada ecossistema apresentou uma comunidade microbiana única e bastante diversa. Estes achados por si só justificam novos estudos moleculares nos solos da região. Os autores ainda informaram que dois por cento das seqüências representaram organismos do Domínio *Archaea*, os quais nunca haviam sido isolados nestes solos.

Fierer e Jackson 2006 avaliaram a composição das comunidades bacterianas ao longo de um transecto abrangendo as Américas do Norte e do Sul, a fim de se verificar se os fatores biogeográficos determinantes da diversidade de bactérias no solo são os mesmos observados para a diversidade de animais e plantas. Os resultados mostraram que foi o pH do solo que determinou a diversidade bacteriana, e não a composição de espécies vegetais ou a latitude. Houve forte correlação entre a diversidade de espécies e o pH em escalas locais; ainda os solos mais ácidos apresentaram os menores índices de diversidade e riqueza de espécies. Os solos com maior pH ($\cong 6.8$) apresentaram riqueza de espécies 60% maior do que os solos ácidos de florestas ($\cong 5.1$). O menor índice de diversidade foi encontrado nos solos da Amazônia Peruana (pH $\cong 4.1$). Os autores afirmam que os padrões biogeográficos observados para as comunidades bacterianas do solo são fundamentalmente diferentes daqueles determinantes da diversidade de macrorganismos.

Kim et al. 2007 realizaram uma descrição mais detalhada da diversidade e estrutura das comunidades de *Bacteria* em solos da floresta nativa e sítios antropogênicos de “terra preta de índio”, na região ocidental da Amazônia para identificar os grupos filogenéticos predominantes. As similaridades entre as comunidades e a diversidade de espécies nos dois solos foram comparadas, por sequenciamento do gene 16S rRNA amostrando 1500 clones. Os resultados obtidos foram de que ambos os solos abrigavam populações semelhantes de bactérias, das quais o filo Acidobacteria foi predominante; entretanto os solos de terra preta suportaram uma riqueza de espécies 25% maior do que os solos da floresta nativa.

Diante do exposto, fica ressaltada a necessidade de se analisar em profundidade as alterações na biomassa microbiana e na diversidade natural das populações microbianas de solos submetidos aos diferentes usos da terra (floresta nativa, pastagem e capoeira) para o entendimento do impacto da ação humana nesses locais.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Local de amostragem

Os trabalhos de campo foram desenvolvidos na Fazenda Nova Vida (10°10'5''S e 62°49'27''W), propriedade privada de 22.000 ha, situada a 250 km ao sul da cidade de Porto Velho, na região central do Estado de Rondônia (Figura 4). O clima local é tropical úmido, com temperatura média anual de 25,5°C e precipitação de 2200 mm (BASTOS; DINIZ, 1982), incluindo uma estação seca de, aproximadamente, quatro a cinco meses (maio a setembro) (Figura 5). A vegetação natural é classificada como floresta tropical úmida (PROJETO RADAMBRASIL, 1978), com amplo número de espécies de palmeiras tais como: *Orbignya barbosiana*, *Oenocarpus spp.*, *Jessenia bataua*, *Euterpe precatoria* and *Maximiliana regia* (PIRES; PRANCE, 1986). O solo predominante é um Podzólico Vermelho Amarelo distrófico, textura média-argilosa, um dos mais representativos da Amazônia brasileira (22%) (MORAES et al., 1996). A equipe do Laboratório de Biogeoquímica Ambiental do Centro de Energia Nuclear na Agricultura vem utilizando a infra-estrutura oferecida pelo proprietário desde 1990. Nessa época foram iniciados estudos de caracterização dos solos, geoestatística dos estoques de carbono, nitrogênio e outros parâmetros físico-químicos, ciclagem de nutrientes e quantificação das trocas gasosas entre o solo e a atmosfera no ecossistema natural e nas pastagens.

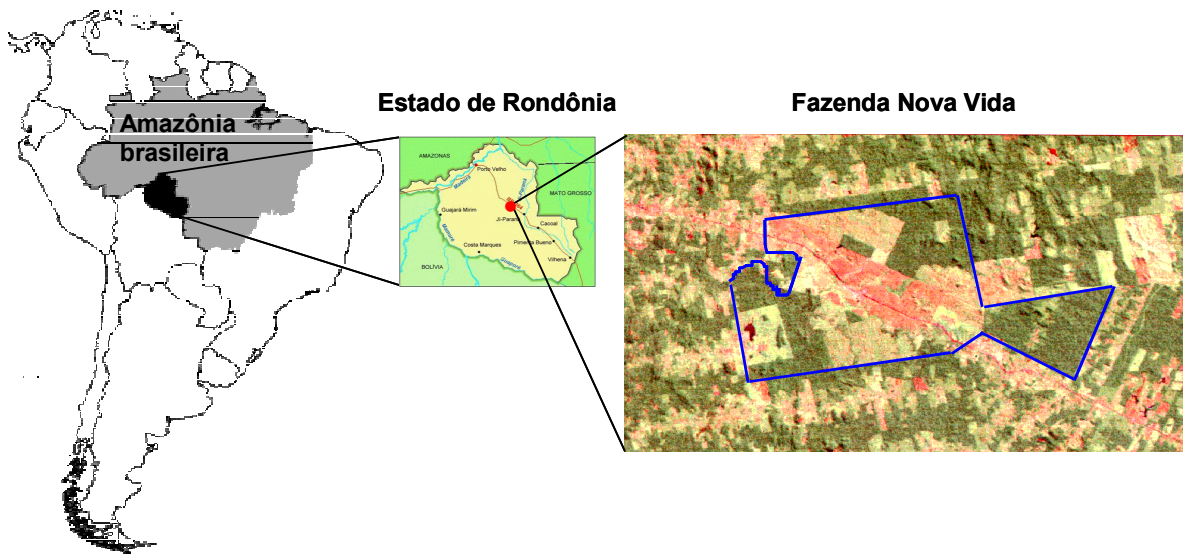


Figura 4 - Localização da área de estudo

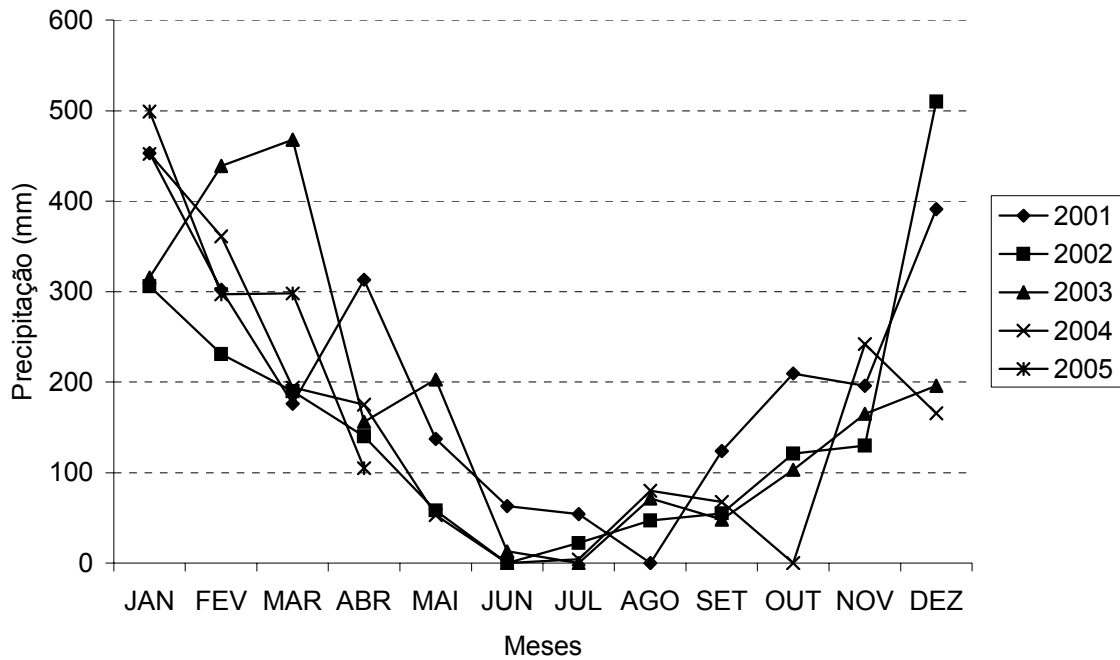


Figura 5 - Precipitação na Fazenda Nova Vida (RO), (Retiro Sede) no período de janeiro de 2001 a abril de 2005

De acordo com o manejo da área, a técnica usual de corte e queima foi utilizada para limpar a floresta após a remoção seletiva das árvores economicamente

importantes. As gramíneas *Brachiaria brizantha* e *Panicum maximum* foram lançadas por avião e as sementes controladas pelo fogo dois anos após o estabelecimento da pastagem. Não foram utilizados fertilizantes químicos e nem prática agrícola mecanizada nos locais de pastagem com gado.

As amostras de solo foram coletadas durante a estação das chuvas (fevereiro) e seca (setembro) de 2004 em uma área preservada sob floresta nativa, uma área de pastagem com *Brachiaria brizantha*, criada em 1987 e desde então, ativa com uma média de 1,5 cabeças/ha; e uma capoeira abandonada desde 1994, após ser utilizada como pastagem (*Brachiaria brizantha* e *Panicum maximum*) desde 1983 (Figuras 6, 7 e 8). A área de capoeira é ocupada predominantemente por 15 a 18% de espécies lenhosas, (*Tabebuia* spp., *Erismia uncinatum* e *Vismia guianensis*), 12% de palmeiras Babaçu (*Orbignya phalerata* Mart), 4 a 11% de espécies daninhas herbáceas e 63.5% de uma mistura de *Brachiaria brizantha* e *Panicum maximum* (FEIGL et al., 2006).



Figura 6 – Área com floresta na Fazenda Nova Vida



Figura 7 – Área com pastagem na Fazenda Nova Vida



Figura 8 – Área de capoeira na Fazenda Nova Vida

Foram escolhidos dois períodos contrastantes (fevereiro – estação das chuvas e setembro – estação seca) em termos de umidade, para se avaliar o efeito de fatores abióticos sobre a biomassa microbiana e sua atividade sob diferentes sistemas de manejo. Estudos anteriores já mostraram que a biomassa microbiana é fortemente influenciada pelas variações sazonais, dentre elas o teor de água do solo (BIJAYALAXMI DEVI; YADAVA, 2006).

Foram coletadas cinco amostras compostas, espaçadas dois metros entre si, sendo que cada amostra composta foi constituída de cinco amostras simples homogêneas, em profundidade 0–10 cm. Foram utilizados tubos de cloreto de polivinil (PVC) para a coleta das amostras em fevereiro, enquanto em setembro foram abertas minitrincheiras (Figura 9). O solo foi peneirado em malha dois mm, para a remoção de pedras e fragmentos de raízes, e mantido sob refrigeração a 3°C. As amostras de solo separadas para acessar a diversidade dos microrganismos, foram mantidas à temperatura de –80°C. Essa temperatura é necessária para o rompimento da parede celular e morte das células microbianas.



Figura 9 - Abertura de minitrincheiras para coleta das amostras de solo

2.2.2 Caracterização química do solo

A quantificação dos macros e micronutrientes do solo foi realizada pelo método descrito por Van Raij et al., 2001. O teor de água foi determinado gravimetricamente após secagem em estufa por 24 horas a 105 °C. O pH foi determinado em solução 0,01 mol L⁻¹ CaCl₂. O fósforo disponível e os cátions básicos trocáveis foram extraídos em resina trocadora de íons. O Ca⁺² e o Mg⁺² foram determinados em espectrofotômetro de absorção atômica e o K⁺ por espectrofotometria de chama. A acidez potencial, expressada pela soma (H⁺ + Al⁺³), foi determinada por titulometria após extração utilizando solução de acetato de cálcio 2 mol. L⁻¹ e o pH ajustado para 7,0.

2.2.3 Carbono e nitrogênio orgânicos totais

As amostras de solo foram secas em temperatura ambiente (TFSA) e peneiradas em malha 100 meshes (0.49 mm). A determinação do carbono e nitrogênio totais, por combustão seca (1350°C), foi feita em auto-analisador LECO CN-2000. Os resultados foram expressos em g kg⁻¹ solo seco.

2.2.4 Nitrogênio mineral e taxas líquidas de mineralização e de nitrificação

O nitrogênio mineral foi obtido por extração com KCl para o tempo 0 e após 7 dias de incubação das amostras em copos plásticos com tampa em laboratório (NEILL et al., 1995). No extrato, as concentrações de amônio (NH₄⁺) e de nitrato (NO₃⁻) foram determinadas pelo sistema automático de injeção de fluxo contínuo (FIA) (RUZICKA; HANSEN, 1981). O NH₄⁺ foi quantificado colorimetricamente pelo método de Solorzano e o NO₃⁻ obtido por condutivimetria na forma de NO₂⁻, após a redução com um catalisador a base de cádmio. A taxa líquida de mineralização foi calculada pela diferença entre N-(NH₄⁺ + NO₃⁻) no final e no início da incubação. A taxa líquida de nitrificação equivale à concentração de NO₃⁻ final menos a inicial. Os dados foram expressos em µg g⁻¹ solo seco.

2.2.5 Carbono e nitrogênio da biomassa microbiana

As amostras de solo tiveram o carbono da biomassa microbiana quantificado pelo método da fumigação-extração (VANCE et al., 1987). O método permite quantificar o carbono e/ou o nitrogênio imobilizados na biomassa microbiana que se torna extraível em solução aquosa de sulfato de potássio ($0,5 \text{ mol l}^{-1}$) após a fumigação do solo com clorofórmio. O vapor do clorofórmio promove a lise das células microbianas, liberando o protoplasma e permitindo a extração do carbono e do nitrogênio. Foram pesados 10 g de solo para a subamostra não fumigada, 10 g para a fumigada e 5 g levados à estufa por 24 horas a 105°C para obtenção da massa da matéria seca de cada amostra. As subamostras foram agitadas por 30 minutos a 150 rpm com 40 ml de solução de K_2SO_4 ($0,5 \text{ mol l}^{-1}$) para a extração do C e N, os quais foram quantificados no equipamento TOC-5000A Shimadzu e pela reação com a ninhidrina (JOERGENSEN; BROOKES, 1990), respectivamente. O carbono e o nitrogênio da biomassa microbiana foram calculados pela diferença entre a quantidade extraída das amostras fumigadas e não-fumigadas. O fator de correção (K_{EC}) utilizado foi 0,3 (FEIGL et al., 1995 b). Os dados foram expressos em mg C ou mg N kg^{-1} de solo seco.

2.2.6 Diversidade do Domínio *Bacteria*

a) Extração de DNA total do solo

A extração de DNA metagenômico do solo foi feita utilizando o Fast DNA® Spin Kit for Soil (Q-Biogene). Foram pesados 0,6 g de solo e adicionados ao tubo matriz de lise, o qual continha uma mistura de partículas de sílica e cerâmica moídas. Em seguida, foram adicionados 978 μl de tampão fosfato de sódio e 122 μl de tampão MT. Os tubos foram agitados horizontalmente por 30 segundos à velocidade 4.0 m s^{-1} em um Fast Prep FP 120 Cell Disruptor (Bio 101, Vista, Califórnia), e em seguida centrifugados a 13,000 g por 30 segundos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo limpo, onde se adicionou 250 μl de reagente PPS e o volume foi misturado sob agitação constante durante 2 minutos. Os tubos foram novamente centrifugados a

13,000 g por 5 minutos para peletizar o precipitado. O sobrenadante foi transferido para um tubo “Falcon”, onde foi adicionado um mililitro de uma solução matriz de sílica. Os tubos foram colocados em rotor durante 2 minutos, para que o DNA pudesse se ligar à solução matriz de sílica e, em seguida, foram deixados em repouso por 3 minutos. Um volume de 500 µl do sobrenadante foi descartado. O volume restante foi ressuspensão na solução matriz, e 600 µl do volume foram transferidos para um tubo spin e centrifugados a 13,000 g durante 1 minuto. O volume de solução que passou pelo filtro foi descartado, o volume restante foi ressuspensão novamente e adicionado ao tubo spin, repetindo-se o mesmo procedimento. Um volume de 500 µl de solução de limpeza de etanol foi adicionado ao tubo spin e o volume centrifugado a 13,000 g por 1 minuto. Descartou-se o líquido que passou pelo tubo spin. Os tubos foram novamente centrifugados a 13,000 g por 2 minutos para secagem da matriz da presença de solução residual de etanol. Os tubos spin foram colocados em tubos limpos e deixados à temperatura ambiente por 5 minutos para secagem final. Adicionaram-se 100 µl de água ultrapura e livre de DNases, e por meio da ponta de uma pipeta o volume de sílica foi ressuspensão para uma eficiente eluição do DNA. Os tubos foram centrifugados a 13,000 g por 1 minuto, concentrando o pélete de DNA microbiano.

b) Amplificação do rDNA 16S

Para a amplificação de fragmentos rDNA 16S de *Bacteria* foi utilizado o conjunto de primers iniciadores BA 338f-GC (5' GCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGCGGGGGCGGGCACGGACTCCTACGGGAGGCAGCAG 3') e UN 518r (5' ATTACCGCGGCTGCTGG 3') (Ovreas et al., 1997). A amplificação foi feita em solução contendo: 2.5 µl de tampão para PCR 10 X, 0.2 µM de cada primer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM DNTPs, 2.5 U Taq DNA polimerase, 60 ng de DNA molde e o volume final completado para 25 µl com água milli Q. O PCR foi realizado em um termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf) nas seguintes condições: 3 minutos de desnaturação inicial à 94°C, seguido de 30 ciclos de temperatura de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento à 55°C por 30 segundos, extensão à 72°C por 2 minutos, e uma extensão final à 72°C por 10 minutos. Em seguida, alíquotas de 4 µl do produto de PCR foram analisadas por

densitometria, após eletroforese em gel de agarose 1% TBE, utilizando-se um densitômetro laser FluorImager (Molecular Dynamics). Como padrão de tamanho e quantidade de DNA foi utilizado o marcador de massa DNA mass ladder (Invitrogen).

c) Análise da estrutura das comunidades de *Bacteria*

Os amplicons do rDNA 16S do Domínio *Bacteria* foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (MUYZER et al., 1993). Os géis de poliacrilamida (8%) foram preparados a partir de uma mistura na proporção 37.5:1 (m:m) de acrilamida/bisacrilamida em tampão TAE 0.5X (10 mM tris-acetato, 0,5 mM EDTA pH 8,0). O gradiente utilizado variou de 15 a 55%, a partir de uma solução desnaturante 100%, contendo 7M de uréia e 40% de formamida e uma solução 0% sem uréia e formamida (OVREAS et al., 1997). Aproximadamente 300 ng de produto de PCR foram carregados por amostra. A eletroforese foi realizada em tampão TAE 0.5X por 3 horas sob voltagem constante de 200 V, e temperatura de 60°C em um sistema de eletroforese vertical DCode (BioRad). Após a eletroforese, os géis foram fixados em solução 10% de ácido acético glacial por 15 minutos. Em seguida, os géis foram lavados três vezes com água destilada, imersos em solução de metanol 50% por 15 minutos, lavados três vezes com água destilada e imersos em solução de SYBR-Green I (1:10.000; v:v) (Molecular Probe, Eugene, Oregon) por 30 minutos. Após a coloração, os géis foram lavados três vezes com água destilada e analisados por densitometria, utilizando-se o densitômetro laser FluorImager e o programa Fragment Analysis (Molecular Dynamics).

2.2.7 Diversidade das bactérias oxidadoras de amônio e de nitrito

a) Extração de DNA total do solo

A extração de DNA total das amostras de solo foi realizada de acordo com o procedimento descrito no item 2.2.6. Em seguida, o DNA total foi purificado em coluna de sephadex G-75 (Sigma) para a retenção de ácidos húmicos, fúlvicos e fenóis, os

quais interferem diretamente na atividade da enzima taq DNA polimerase. O procedimento foi feito pesando-se 10g de sephadex G-75, adicionando-se água milli-Q até se completar o volume de 100 ml, o qual foi autoclavado. Em seguida, 2% de polivinilpolipirrolidona, compreendendo 200 mg, foram adicionados e o volume final utilizado para preencher as colunas das seringas plásticas de cinco mililitros. A amostra de DNA total foi depositada na coluna de sephadex. Após alguns minutos, o volume que passou pela coluna foi coletado, e o DNA total quantificado em espectrofotômetro Nanodrop 3.1.

b) Amplificação do rDNA 16S

Para a amplificação de fragmentos rDNA 16S do grupo de bactérias oxidadoras de amônio, foi utilizada a técnica nested PCR com os primers eubacterianos fD1 (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e rD1 (5' AAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC 3') (WEISBURG et al., 1991), seguidos por uma segunda amplificação com os primers CTO 189f (5' GGAGRAAAGYAGGGGATCG 3') e CTO 654r (5' CTAGCYTTGTAGTTT CAAACGC 3') (KOWALCHUK et al., 1997). A amplificação foi feita em solução contendo: 2.5 µl de tampão para PCR 10 X, 0.2 µM de cada primer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM DNTPs, 10 µg de albumina serum bovina (BSA), 2.5 U Taq DNA polimerase, 30 ng de DNA molde e o volume final completado para 25 µl com água milli-Q. O PCR foi realizado em um termociclador (GeneAmp, Perkin-Elmer) nas seguintes condições: um ciclo de 4 minutos à 94°C; 35 ciclos de desnaturação de 60 segundos à 94°C, anelamento por 45 segundos à 55°C, extensão por 90 segundos à 72°C e uma extensão final de 15 minutos à 72°C.

Previamente à segunda amplificação, os produtos de PCR foram diluídos 1:50 e 2 µl da diluição foram usados como DNA molde em uma segunda amplificação contendo: 2.5 µl de tampão para PCR 10 X, 0.2 µM de cada primer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM DNTPs, 10 µg de BSA, 2.5 U Taq DNA polimerase, e o volume final completado para 25 µl com água milli-Q. O PCR foi realizado em um termociclador (GeneAmp, Perkin-Elmer) nas seguintes condições: desnaturação inicial por 4 minutos à 94°C, 30 ciclos de desnaturação por 30 segundos à 94°C, anelamento por 30 segundos à 55°C,

extensão por 45 segundos à 72°C (com o tempo aumentando um segundo/ciclo); e uma extensão final de 15 minutos à 72°C. Os produtos de PCR foram avaliados em um densitômetro Eagle Eye, após eletroforese em gel de agarose TAE 1%. Como padrão de tamanho e quantidade de DNA foi utilizado o marcador de massa DNA mass ladder (Invitrogen).

A amplificação de fragmentos rDNA 16S do grupo de bactérias oxidadoras de nitrito foi realizada por meio dos primers específicos FGPS 1269 (5' TTTTTTGAGATT TGCTAG 3') e FGPS 872 (5' CTAAACTCAAAGGAATTGA 3') (DEGRANGE; BARDIN, 1995). A amplificação foi feita em solução contendo: 2.5 µl de tampão para PCR 10 X, 0.5 µM de cada primer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM DNTPs, 10 µg de BSA, 2.5 U Taq DNA polimerase, 30 ng de DNA molde e o volume final completado para 25 µl com água milli-Q. O PCR foi realizado em um termociclador (GeneAmp, Perkin-Elmer) nas seguintes condições: um ciclo de desnaturação de 3 minutos à 95°C; 35 ciclos de desnaturação de 60 segundos à 95°C, anelamento por 60 segundos à 50°C, extensão por 60 segundos à 72°C e uma extensão final de 3 minutos à 72°C. Os produtos de PCR foram avaliados em um densitômetro Eagle Eye, após eletroforese em gel de agarose TAE 1%. Como padrão de tamanho e quantidade de DNA foi utilizado o marcador de massa DNA mass ladder (Invitrogen).

c) Purificação de produto de PCR

Previamente às etapas de transformação e clonagem, os fragmentos rDNA 16S obtidos por PCR, foram submetidos a uma purificação com o kit QIAquick (Qiagen, Tech.), a fim de se eliminar contaminantes originários da reação de amplificação.

Para o grupo de bactérias oxidadoras de amônio foram escolhidas uma amostra representativa de cada local e estação climática, de modo que as amostras de número 4, 8, 15, 18, 23 e 28 representaram as áreas de floresta – estação chuvosa, pastagem – estação chuvosa, capoeira – estação chuvosa, floresta – estação seca, pastagem – estação seca e capoeira – estação seca, respectivamente.

Todo o produto de PCR de volume 25 µl foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% TAE 1X. Após a constatação da presença do fragmento de 465 pb, o

fragmento de DNA foi excisado do gel de agarose com o auxílio de bisturi. O tamanho do gel foi minimizado a fim de se evitar coletar excesso de agarose. Cada pedaço de gel foi pesado e em seguida, adicionaram-se três volumes de tampão solubilizador de agarose QG para cada volume de gel de agarose. Os tubos foram incubados em banho-maria por 10 minutos a 50°C, e um volume de isopropanol, igual ao volume do gel de agarose, foi adicionado à amostra e misturado. Em seguida, 800 µl da mistura foram adicionados ao tubo spin e centrifugados a 13,000 rpm durante 1 minuto. O volume que passou pelo tubo foi descartado, e o restante foi adicionado ao tubo spin, repetindo-se o mesmo procedimento. Adicionou-se 500 µl de tampão QG ao tubo spin e centrifugou-se a 13,000 rpm por 1 minuto, para a remoção completa de traços de agarose. Para a lavagem, 750 µl de tampão PE foi adicionado ao tubo spin e os tubos deixados em repouso por 5 minutos, antes de serem centrifugados a 13,000 rpm por 1 minuto. O volume de solução que passou pelo filtro foi descartado, e os tubos foram centrifugados por mais 1 minuto a 13,000 rpm. Os tubos spin foram acoplados a tubos de microcentrífuga, onde se adicionou 30 µl de água milli-Q no centro da membrana do filtro, procedendo-se à centrifugação final por 1 minuto a 13,000 rpm. O volume coletado correspondeu a 28 µl do produto de PCR esterilizado e pronto para a reação de transformação.

Para o grupo de bactérias oxidadoras de nitrito foram escolhidas uma amostra representativa de cada local durante a estação chuvosa apenas, visto que não ocorreu amplificação de nenhuma das amostras coletadas durante a estação seca. Dessa forma, as amostras de número 5, 8 e 15 representaram as áreas de floresta, pastagem e capoeira – estação chuvosa, respectivamente.

Após a verificação da presença de banda de 397 pb, o volume de 20 µl do produto de PCR foi submetido à purificação adicionando-se cinco volumes de tampão PB para cada volume de amostra e misturando-se em seguida. O volume total foi adicionado ao tubo spin, centrifugado por 1 minuto a 13,000 rpm e descartado o que passou pela coluna do tubo spin. O tubo spin foi centrifugado por mais 1 minuto a 13,000 rpm para limpeza de resíduos de etanol, e colocado em um tubo limpo de microcentrífuga. Para a eluição do DNA, foram adicionados 30 µl de água milli-Q no centro da membrana do filtro, procedendo-se à centrifugação final por 1 minuto a

13,000 rpm. O volume coletado correspondeu a 28 μ l do produto de PCR esterilizado e pronto para a reação de transformação.

d) Transformação e clonagem

A transformação em células quimicamente competentes de *Escherichia coli* foi feita utilizando-se o TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen, Tech). Foi preparado o meio LB (Luria-Bertani) sólido adicionando-se 25 g de extrato LB, 15 g de agar bacto, o volume final completado para 1l com água milli-Q e o pH ajustado para 7.5 com solução de NaOH 10N. O meio LB líquido foi preparado adicionando-se 25 g de extrato LB, 956 ml de água milli-Q e o pH ajustado para 7.5 com solução de NaOH 10N. Os meios LB sólido e líquido, bem como um volume separado de 44 ml de glicerol foram autoclavados a 121°C por 20 minutos. Assim que a temperatura do frasco contendo o meio LB sólido alcançou 60°C, o antibiótico kanamicina (50 μ g/ml) foi adicionado e o volume vertido em placas de Petri descartáveis. Após esfriarem, as placas foram invertidas e guardadas no escuro à temperatura de 4°C. No momento em que a temperatura do meio LB líquido alcançou 60°C, misturou-se o volume de 44 ml de glicerol e o antibiótico kanamicina (50 μ g/ml). O meio LB líquido foi mantido no escuro à temperatura de 4°C, até o momento de ser transferido para os blocos de crescimento estéreis.

Anteriormente à reação de transformação em células competentes de *E. coli* foi preparada uma reação para adição de dioxadenosina (A) ao inserto de PCR purificado, uma vez que as etapas de purificação resultam em perda de 3'A necessário para a ligação com a molécula de dioxitimina (T) do plasmídeo vetor pCR4-TOPO. A reação de ligação ocorreu pela adição de 2.5 μ l de tampão para PCR 10 X, 3 mM MgCl₂, 1 mM dATP, 0.5 U taq DNA polimerase, 20 ng de inserto de PCR purificado e o volume final completado para 26.6 μ l com água milli-Q. Os tubos foram incubados a 72°C por 10 minutos.

A transformação ocorreu em tubos de microcentrifuga 1.5 ml mantidos no gelo, onde foram adicionados os seguintes reagentes: 3 μ l (20 ng) do inserto previamente preparado, 1 μ l de solução de sal, 1 μ l de água estéril e 1 μ l de vetor pCR 4-TOPO. Os

tubos foram misturados gentilmente e incubados por 30 minutos a temperatura ambiente. Durante este período, as células competentes foram colocadas no gelo, o meio SOC foi mantido em temperatura ambiente para descongelamento e as placas de Petri contendo meio LB sólido foram levadas à estufa 37°C. Após os 30 minutos de incubação, 4 µl da reação de clonagem foram adicionados ao tubo de célula quimicamente competente de *E. coli*, misturados gentilmente e incubados no gelo por 30 minutos. Imediatamente após este período, as células competentes foram mantidas por 2 minutos a 42°C e em seguida mantidas no gelo. Adicionaram-se 250 µl de meio SOC. e os tubos foram levados em agitador horizontal (200 rpm) por 60 minutos a 37°C. As placas de Petri foram tiradas da estufa, inoculadas com volumes de 50 µl do produto transformado e levadas à estufa novamente para o crescimento dos clones de *E. coli*.

Para se ter certeza da presença do inserto nos clones de *E. coli*, foi preparada uma reação de PCR utilizando os primers M13F (5' GTAAAACGACGGCCA G 3') e M13R (5' CAGGAAACAGCTATGAC 3') do kit TOPO TA (Invitrogen). A reação de PCR foi preparada adicionando-se 2.5 µl de tampão para PCR 10 X, 3 mM MgCl₂, 0.2 µM de cada primer, 0.2 mM DNTPs, 0.5 µg BSA, 0.625 U taq DNA polimerase e o volume final completado para 25 µl com água milli-Q. A reação de PCR foi realizada nas seguintes condições: um ciclo de desnaturação de 10 minutos à 94°C; 30 ciclos de desnaturação de 60 segundos à 94°C, anelamento por 60 segundos à 55°C, extensão por 60 segundos à 72°C e uma extensão final de 7 minutos à 72°C. Os produtos de PCR foram avaliados em densitômetro Eagle Eye, após eletroforese em gel de agarose TAE 1%. Como padrão de tamanho e quantidade de DNA foi utilizado o marcador de massa DNA mass ladder (Invitrogen).

Após a confirmação da presença do inserto nos clones de *E. coli*, os clones crescidos nas placas de Petri foram transferidos para o bloco de crescimento com o auxílio de palitos esterilizados. Para cada amostra dos grupos de bactérias oxidadoras de amônio e de nitrito, foram transferidos 96 clones completando um bloco de crescimento. Os blocos foram levados à estufa 37°C e incubados "overnight" para o maior crescimento dos clones em meio LB líquido. Em seguida, 2 µl do volume de

células foram transferidos para placas, com o auxílio de pipeta multicanal, e as placas levadas à estufa 37°C e incubadas “overnight” para crescimento dos clones de *E. coli*.

e) Sequenciamento do rDNA 16S

As placas contendo os clones de *E. coli* crescidos foram enviadas à Macrogen Inc. (Coréia do Sul), para a extração de DNA plasmidial e sequenciamento.

f) Análise filogenética das seqüências rDNA 16S

Para a análise da diversidade de bactérias nitrificadoras, foram identificadas as seqüências quiméricas de 16S rRNA provenientes de cada grupo de clones através do programa Bellerophon (HUBER et al., 2004). As seqüências livres de quimeras foram transformadas em pequenos bancos de dados no formato FASTAS para análises futuras.

Em seguida, foi realizada uma busca no Genbank (BENSON et al., 2005) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) com o intuito de selecionar as seqüências disponíveis de Alfa-proteobactéria e Beta-proteobactéria. Estas buscas foram realizadas de forma restritiva segundo o seguinte protocolo:

1. Apenas as seqüências em formato FASTA foram armazenadas;
2. Selecionadas apenas seqüências provenientes de espécies de α -proteobactéria e β -proteobactéria de acordo com a árvore filogenética proposta para estes grupos (CICCARELLI et al., 2006);
3. Excluídas proteínas hipotéticas, prováveis e similares;
4. Removidos genes redundantes (pseudo genes e parálogos recentes);

Para cada grupo (α e β -proteobactéria) foi compilado um banco de dados local para utilização do programa MEGABLAST (ALTSCHUL et al., 1990), de acordo com o manual do programa.

As seqüências de α e β -proteobactéria foram identificadas confrontando as seqüências dos clones livres de quimeras contra o banco de dados específico, descrito anteriormente, utilizando-se o programa MEGABLAST. Desta busca foram descartadas

as seqüências onde o “*e-value*” foi superior a um valor arbitrário específico para cada grupo (variando de 2×10^{-178} a 4×10^{-180}) e pelo menos 60% da seqüência de resposta foi coberta, com no mínimo de 90% de similaridade (HUANG et al., 2004).

Os alinhamentos foram realizados através do software Clustal W-MPI (THOMPSON et al., 1994; LI, 2003) e refinados manualmente pelos programas Seaview (GALTIER et al., 1996) para linux ou BioEdit (Ibis therapeutics, CA, USA) para Windows.

A análise de Neighbor-Joining (NJ) foi aplicada para se obter a distância fenética entre os clones de 16S rRNA e os dados dos bancos de α e β -proteobactéria. Estas análises foram realizadas utilizando-se o software MEGA 3.1 (KUMAR et al., 2004) para Windows. A robustez de cada ramo foi determinada pelo teste não paramétrico de bootstrap (FELSENSTEIN, 1985) com 500 replicações.

2.2.8 Delineamento experimental

Os valores dos atributos químicos do solo, C e N totais do solo, C e N da biomassa microbiana, as concentrações de amônio e nitrato e as taxas líquidas de mineralização e de nitrificação representam a média \pm desvio padrão. Os resultados foram tratados estatisticamente por meio de análise de variância, em delineamento inteiramente casualizado segundo o esquema fatorial, com cinco repetições. O teste de Tukey a 5% de probabilidade foi utilizado para comparação de médias.

A estrutura das comunidades de *Bacteria* foi avaliada com base na presença ou ausência das bandas detectadas no gel, através do programa Diversity Database (Bio Rad), sendo gerada a partir daí uma tabela de dados binários. Os padrões de bandeamento foram analisados por agrupamento hierárquico, utilizando-se a distância Euclidiana como unidade de medida das comunidades por meio do programa Systat 8.0.

Em seguida foi feita a análise de componentes principais (PCA) com o objetivo de relacionar a estrutura da comunidade bacteriana com os atributos químicos e microbiológicos do solo. Para isso, foi realizada uma análise “Non-Metric Multidimensional Scaling” (NMDS) com os dados de presença e ausência de amplicons,

utilizando o índice de similaridade de Jaccard. As coordenadas calculadas em um espaço de ordenação pela NMDS foram utilizadas na PCA.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Propriedades químicas do solo

A análise granulométrica revelou que a mudança de uso da terra não alterou a textura dos solos, tanto que todas as áreas apresentaram as mesmas porcentagens de argila (26-30%), areia (64-70%) e silte (4-6%).

A derrubada da floresta para introdução de pastagens alterou significativamente as propriedades químicas do solo (Tabela 1). A deposição das cinzas formadas durante a queima da vegetação natural elevou o pH e o teor de cátions K^+ , Ca^{2+} e Mg^{3+} trocáveis no solo, assim como reduziu o nível de acidez trocável. O pH do solo aumentou 30% nas áreas de pastagem e capoeira, em relação à floresta nativa. Comparando-se as estações chuvosa e seca, o pH não decresceu nas áreas de floresta e pastagem, enquanto que na capoeira, houve uma redução de 12%, como consequência do decréscimo dos teores de Ca^{2+} e Mg^{3+} e o aumento expressivo de Al^{3+} .

Aumentos de pH são significativos na camada superficial (0-10 cm) do solo e em pastagens jovens, porém este tende a decrescer após 3 a 5 anos do período de instalação da pastagem (MORAES et al., 1996).

Em pastagens bem manejadas o pH e os cátions trocáveis se mantêm elevados por 15 anos após seu estabelecimento (FEIGL et al., 1995a). Entretanto, Cleveland et al. (2003) observaram valores menores de pH em pastagens da região sudoeste da Costa Rica, devido à ausência de queima da floresta como estratégia de manejo.

Tabela 1 – Características químicas (média ± desvio padrão) da camada 0-10 cm do solo sob floresta nativa, pastagem e capoeira

Uso da terra	pH	Umidade	P	S	K	Ca	Mg	Al	H + Al	SB
	CaCl ₂	%	----- mg dm ⁻³ -----			----- mmol c dm ⁻³ -----				
Estação chuvosa										
Floresta	3,9 ^{B*} ± 0,2	20,0 ^B ± 1,7	5,2 ^A ± 1,1	6,6 ^A ± 0,9	0,9 ^A ± 0,3	4,4 ^B ± 1,5	3,8 ^B ± 2,4	8,8 ^A ± 3,5	41,8 ^A ± 6,5	11,5 ^B ± 8,9
Pastagem	4,9 ^A ± 0,2	24,9 ^A ± 2,7	7,4 ^A ± 2,3	5,2 ^B ± 0,8	1,5 ^A ± 0,5	26,2 ^A ± 7,1	6,4 ^{AB} ± 1,5	0,6 ^B ± 0,2	23,6 ^B ± 4,8	34,1 ^A ± 8,5
Capoeira	5,0 ^A ± 0,2	21,3 ^B ± 1,8	5,8 ^A ± 2,0	5,2 ^B ± 0,4	1,3 ^A ± 0,3	25,8 ^A ± 7,3	7,2 ^A ± 0,8	0,4 ^B ± 0,1	21,2 ^B ± 1,1	34,3 ^A ± 6,9
Estação seca										
Floresta	3,8 ^C ± 0,2	8,3 ^A ± 1,3	4,8 ^{AB} ± 1,5	6,2 ^A ± 1,1	0,6 ^A ± 0,3	1,4 ^B ± 0,9	1,2 ^C ± 0,4	11,0 ^A ± 1,2	36,8 ^A ± 6,2	3,2 ^B ± 1,6
Pastagem	4,9 ^A ± 0,2	8,3 ^A ± 0,9	5,2 ^A ± 2,6	4,8 ^{AB} ± 0,8	1,9 ^A ± 1,4	22,2 ^A ± 12,1	5,0 ^A ± 1,0	1,8 ^B ± 0,8	20,2 ^B ± 3,5	29,1 ^A ± 10,0
Capoeira	4,4 ^B ± 0,1	6,4 ^A ± 0,6	2,0 ^B ± 0,7	4,4 ^B ± 0,5	0,8 ^A ± 0,3	7,8 ^B ± 4,0	3,2 ^B ± 1,5	4,0 ^B ± 1,6	22,8 ^B ± 2,2	11,8 ^B ± 5,6

*Médias seguidas de mesma letra dentro de uma época, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A umidade variou entre 6,4% (capoeira – estação seca) a 24,9% (pastagem – estação úmida). Os solos sob a cobertura de gramínea retiveram mais água do que os de floresta e capoeira devido a aumentos na densidade, consequência comum da compactação do solo, redução da porosidade total e da presença do gado pastejando (CERRI et al., 2005). Durante a estação seca, a umidade foi reduzida 58.5% na floresta, 66.7% na pastagem e 70% na capoeira, indicando que na floresta a oscilação de umidade foi menor do que nos demais sistemas. Dentre os fatores abióticos, a umidade é um dos que exerce maior influência sobre as populações microbianas do solo e a dinâmica dos nutrientes. Diaz-Ravina et al. (1995) afirmam que a falta de água é mais limitante para o desenvolvimento dos microrganismos do solo do que a temperatura. Outros autores obtiveram correlação altamente significativa entre a umidade e a biomassa microbiana do solo em ecossistema florestal (SANTRUCKOVA, 1992) e agrícola (LYNCH; PANTING, 1982).

Não foram observadas diferenças significativas nos teores de fósforo disponível na sucessão floresta-pastagem-capoeira. Na estação seca, o teor de P na pastagem se diferenciou da capoeira, mas foi similar ao da floresta. Fernandes et al. 2002 obteve os maiores teores de P disponível na floresta. Por sua vez, Moraes et al. (1996) reportaram que o P orgânico aumenta de acordo com o acúmulo de MOS no solo na área de pastagem. Sob temperatura e umidade elevadas, o P orgânico é mineralizado, para posterior absorção pelas raízes de gramíneas.

A concentração de enxofre esteve entre 5,2 a 6,6 mg dm⁻³ (estação chuvosa), sendo maior na floresta, seguida pela pastagem e capoeira. Na estação seca, o S variou de 4,4 a 6,2 mg dm⁻³, havendo diferença significativa entre a floresta e a capoeira, enquanto a concentração na pastagem foi intermediária.

Os teores de cátions trocáveis foram diferentes. Durante a estação chuvosa, as concentrações de Ca²⁺ e de Mg³⁺ foram 4,4 e 3,8 mmol c dm⁻³ - floresta, 26,2 e 6,4 mmol c dm⁻³ - pastagem e 25,8 e 7,2 mmol c dm⁻³ - capoeira. Uma tendência similar foi observada na estação seca, com a pastagem concentrando os teores mais elevados de Ca²⁺ e Mg³⁺: 22,2 e 5,0 mmol c dm⁻³, seguida pela capoeira e floresta. Variações nas concentrações de Ca²⁺ foram maiores do que as observadas para o Mg³⁺. As concentrações de K⁺ entre as áreas não foram significativas em nenhuma das épocas.

As concentrações de Al bem como a acidez potencial (H + Al) foram maiores na floresta do que na pastagem e capoeira. As diferenças nos valores de soma de bases entre as áreas de estudo refletiram as concentrações elevadas de Ca^{2+} , Mg^{3+} e K^+ na pastagem e capoeira, comparadas à floresta.

2.3.2 Carbono e nitrogênio orgânicos totais

Os teores de C e de N orgânicos apresentados na Tabela 2 foram maiores durante a estação das chuvas, devido à elevada temperatura e umidade na região (Tabela 1), fatores que favoreceram o crescimento e desenvolvimento vegetal.

A quantidade de matéria orgânica no solo foi influenciada pelas mudanças sazonais, as quais determinam diferentes fases de acumulação e perda de material orgânico no solo. Os picos mais elevados de acúmulo de C e de N totais nesses solos ocorreram durante a estação chuvosa (FEARNSIDE; BARBOSA, 1998).

Tabela 2 – Carbono e nitrogênio orgânico totais (g kg^{-1} solo seco), com média \pm desvio padrão em solos da Fazenda Nova Vida

Uso da Terra	Carbono	Nitrogênio	C/N
	----- g kg^{-1} solo seco -----		
Estação chuvosa			
Floresta	13,9 ^{B*} \pm 1,7	1,2 ^B \pm 0,1	11,6 ^{AB} \pm 0,5
Pastagem	26,5 ^A \pm 5,7	2,0 ^A \pm 0,6	13,2 ^A \pm 2,1
Capoeira	18,3 ^B \pm 3,3	1,6 ^B \pm 0,4	11,4 ^B \pm 0,9
Estação seca			
Floresta	10,4 ^B \pm 3,0	0,8 ^B \pm 0,2	13,0 ^B \pm 0,7
Pastagem	19,7 ^A \pm 3,9	1,3 ^A \pm 0,2	15,1 ^A \pm 0,8
Capoeira	11,5 ^B \pm 1,5	0,8 ^B \pm 0,1	14,3 ^{AB} \pm 1,2

*Médias seguidas de mesma letra dentro de uma época, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na Fazenda Nova Vida, a implantação de pastagens promoveu aumentos nos conteúdos de C e N orgânico total. Os valores 26,5 e 2,0 g kg⁻¹ solo seco de C e de N, para o sistema de pastagem, encontrados neste estudo durante a estação chuvosa, são próximos aos obtidos por outros autores (MORAES et al., 1995; NEILL et al., 1996; PICCOLO et al., 1996, FERNANDES, 1999).

Os dados da literatura confirmam que o uso de pastagem é um dos melhores manejos para se aumentar o estoque de C no solo. Espécies do gênero *Brachiaria* possuem elevada capacidade de acumular C no solo devido à produção de grandes quantidades de massa seca e, principalmente, à intensa renovação de seu sistema radicular abundante e permanente (CERRI et al., 2003; CERRI et al., 2004). No entanto, em outros estudos como o de Desjardins et al., (1994), ocorreram decréscimos no conteúdo de C com a instalação da pastagem, enquanto Serrão et al., 1979 e Hetch, 1982 observaram que a concentração de C no solo permaneceu inalterada. Fatores como a variação espacial e temporal, o manejo e o tipo de solo, são responsáveis pelas diferenças nos estoques de C nesses solos.

Os ganhos de C e de N na capoeira durante as estações chuvosa (18,3 e 1,6 g kg⁻¹ solo seco) e seca (11,5 e 0,8 g kg⁻¹ solo seco) foram menores do que na pastagem, mas estatisticamente similares à floresta (13,9 e 1,2 g kg⁻¹ solo seco – estação das chuvas; 10,4 e 0,8 g kg⁻¹ solo seco – estação seca). Por representar uma pastagem abandonada que perdeu a produtividade, os conteúdos de C e de N se assemelharam aos da floresta original. Os menores ganhos de C e N na capoeira podem estar também relacionados à cobertura desigual de gramíneas, e ao elevado grau de infestação por plantas daninhas invasoras (FEIGL et al., 2006). Ainda a capoeira tem uma função essencial, a reassimilação de parte do carbono que foi liberado a partir do corte e queima da floresta original (SCHROTH et al., 2002). Na floresta, a ciclagem dos nutrientes contidos na serapilheira ocorre de forma policíclica, contribuindo assim para um menor estoque de C e de N nesses solos (FEIGL et al., 1995a; MORAES et al., 1996; NEILL et al., 1997a; FERNANDES et al., 2002).

A relação C/N do solo variou entre 11,4 (capoeira – estação chuvosa) a 15,1 (pastagem – estação seca) entre as áreas, entretanto os valores foram maiores na superfície sob pastagem. A qualidade da serapilheira de floresta e pastagens difere

marcadamente, variando de composição lenhosa, rica em lignina para um substrato mais celulósico. Os dados presentes são consistentes com um acúmulo maior de C, comparado ao N, em pastagens mais velhas (CERRI et al., 2003).

Uma das conseqüências do corte e queima da floresta é a imediata disponibilidade de N (FEARNSIDE, 2005). A fixação biológica do N₂ também contribui para o aumento do teor de N, visto que não foram aplicados fertilizantes nitrogenados nas pastagens da Nova Vida. Piccolo et al. (1996), utilizando técnicas isotópicas, observaram uma diminuição do valor de ¹⁵N em uma cronosequência floresta/pastagem. Os autores sugeriram que isto se deve à fixação de N na pastagem por meio da associação da gramínea com bactérias de vida livre. Day et al. (1975) obteve valores de atividade da enzima nitrogenase entre 239 a 750 nanomols de C₂H₄/h/g em raízes de gramíneas forrageiras como *Brachiaria mutica*, *Panicum maximum* e *Pennisetum purpureum*.

2.3.3 Nitrogênio mineral e taxas líquidas de mineralização e de nitrificação

Os teores de N mineral, definidos como a soma das formas amoniacal (NH_4^+) e nítrica (NO_3^-), foram maiores durante a estação chuvosa (Figura 10).

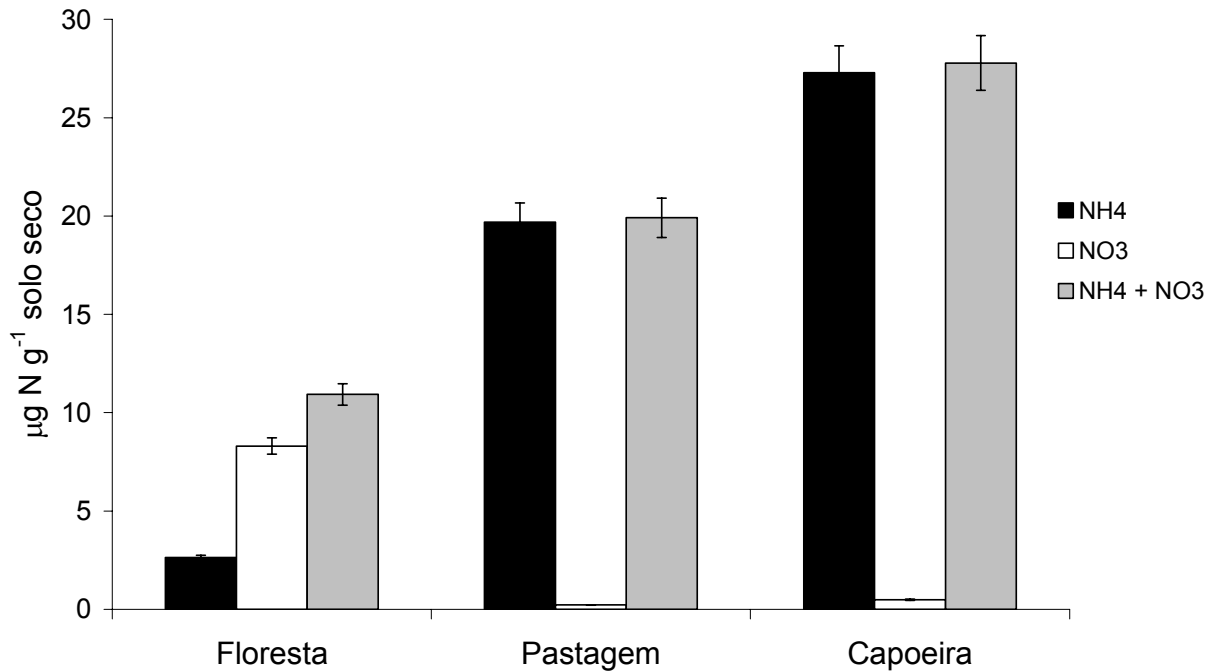


Figura 10 – Teores de NH_4^+ , NO_3^- e soma de $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$ ($\mu\text{g N g}^{-1}$ solo seco) em amostras de solo durante a estação das chuvas. Médias seguidas de mesma letra dentro de um atributo não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Estes resultados contrastam com os de Fernandes (1999), quando a autora observou maior presença de nitrogênio mineral na estação seca. O estoque de N mineral foi maior na capoeira ($27,8 \mu\text{g N g}^{-1}$ solo seco), seguido pela pastagem ($19,9 \mu\text{g N g}^{-1}$ solo seco) e pela floresta ($10,9 \mu\text{g N g}^{-1}$ solo seco), contrastando também com os resultados de outros autores (PICCOLO et al., 1994; NEILL et al., 1995; NEILL et al., 1996), que observaram maior estoque de N mineral extraível na superfície de floresta.

O N em forma amoniacal predominou na capoeira ($27,3 \mu\text{g N g}^{-1}$ solo seco), seguida pela pastagem ($19,7 \mu\text{g N g}^{-1}$ solo seco), enquanto o nitrato foi a principal

forma presente na floresta ($8,3 \mu\text{g N g}^{-1}$ solo seco) na estação chuvosa. O amônio representou 98% do total de N mineral da pastagem e capoeira, enquanto na floresta a porcentagem foi de 24%. Gramíneas, como a braquiária e o capim-colonião, apresentam altas taxas de crescimento e são eficientes na absorção de NH_4^+ (NEILL et al., 1999; GARCIA-MONTIEL et al., 2001). O nitrato correspondeu a 2% do N mineral presente na pastagem e capoeira, e a 76% na floresta nativa.

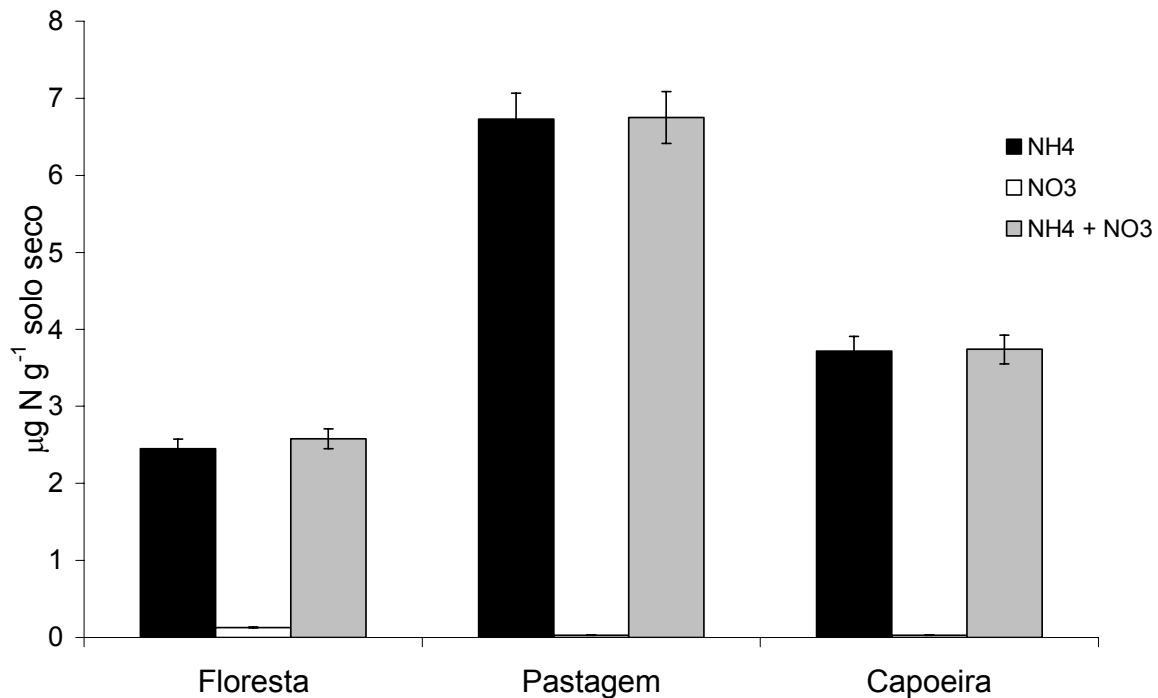


Figura 11 – Teores de NH_4^+ , NO_3^- e soma de $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$ ($\mu\text{g N g}^{-1}$ solo seco) em amostras de solo durante a estação seca. Médias seguidas de mesma letra dentro de um atributo não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Durante o período seco, a pastagem produziu $6,7 \mu\text{g N g}^{-1}$ solo seco de amônio (Figura 11), quantidade significativamente maior do que nas demais áreas. A produção de nitrato foi muito baixa na floresta ($0,13 \mu\text{g N g}^{-1}$ solo seco), e quase nula na pastagem e na capoeira ($0,03 \mu\text{g N g}^{-1}$ solo seco).

As baixas concentrações de NO_3^- na pastagem e na capoeira durante as épocas de amostragem (Figuras 10 e 11) podem estar relacionadas à presença de microssítios anaeróbios e à elevada atividade respiratória das raízes de gramíneas (CARMO et al.,

2005). Estudos realizados em Manaus (MATSON et al., 1990; LUIZÃO et al., 1992) e em áreas de florestas tropicais convertidas em pastagens na Costa Rica (REINERS et al., 1994), confirmam esta tendência. Os teores de amônio e de nitrato obtidos na capoeira foram próximos aos da pastagem, justamente por se caracterizar como uma pastagem abandonada, em processo de conversão em floresta secundária.

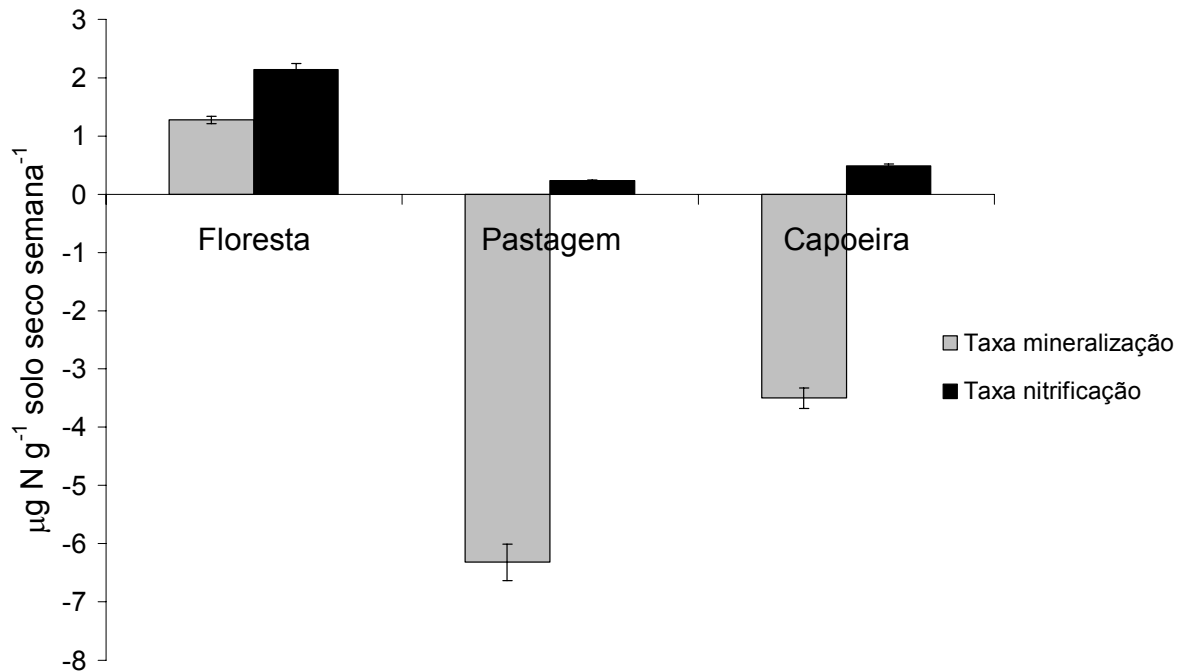


Figura 12 – Taxas líquidas de mineralização e de nitrificação ($\mu\text{g N g}^{-1} \text{ solo dia}^{-1}$) em amostras de solo durante a estação das chuvas. Médias seguidas de mesma letra dentro de um atributo não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

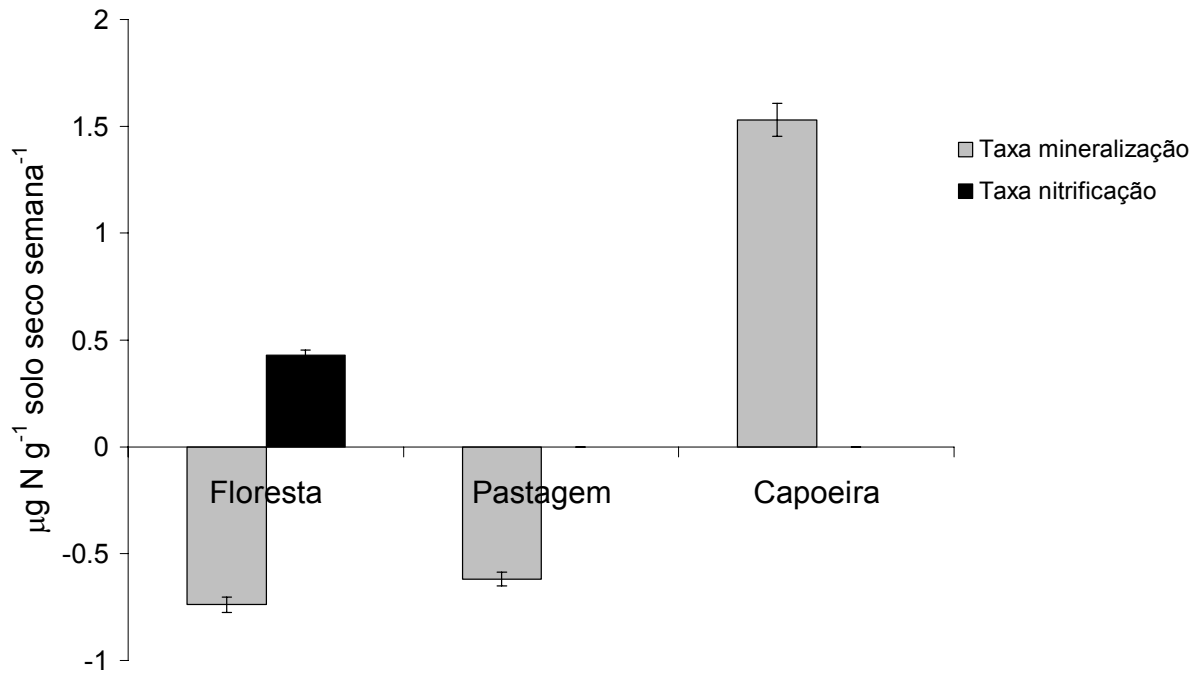


Figura 13 – Taxas líquidas de mineralização e de nitrificação ($\mu\text{g N g}^{-1}$ solo dia^{-1}) em amostras de solo durante a estação seca. Médias seguidas de mesma letra dentro de um atributo não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

As taxas líquidas de mineralização e de nitrificação sofreram decréscimos ao longo da cronossequência durante o período chuvoso (Figura 12). A floresta nativa apresentou as taxas mais elevadas de mineralização e de nitrificação do N ($1,3 \mu\text{g N g}^{-1}$ solo dia^{-1}) e ($2,1 \mu\text{g g}^{-1}$ solo dia^{-1}), respectivamente, enquanto na pastagem e na capoeira os valores foram baixos ou negativos, predominando a imobilização microbiana. Na estação seca, a taxa de mineralização na floresta e na pastagem foi negativa; enquanto na capoeira, excepcionalmente, o valor obtido foi $1,5 \mu\text{g N g}^{-1}$ solo dia^{-1} (Figura 13). A taxa de nitrificação foi maior na floresta nativa ($0,4 \mu\text{g N g}^{-1}$ solo dia^{-1}) e nula na pastagem e capoeira, devido às quantidades de nitrato estar próximas ao valor zero.

O desmatamento da floresta pode acarretar mudanças importantes na ciclagem do N, como aumentar o estoque de N mineral e as taxas de mineralização e de nitrificação. Contudo, após um breve período de transformações, a ciclagem do N

gradualmente declina com o aumento da idade das pastagens (NEILL et al., 1995; NEILL et al., 1997; FERNANDES, 1999). Os resultados obtidos sugerem que na floresta, onde a serapilheira é rapidamente reciclada na superfície do solo, a disponibilidade de C é baixa, mas a do N e as taxas de mineralização e nitrificação são altas. Dessa forma, a maior parte do N mineralizado é rapidamente nitrificada e a imobilização microbiana é normalmente baixa (NEILL et al., 2006). Nas áreas de pastagem e capoeira, a entrada de carbono através da serapilheira depositada em superfície é menor do que na floresta, porém a entrada de C lábil na forma de raízes e rizodépósitos é maior. Isso tem o efeito de, primeiramente reduzir a disponibilidade de N para as gramíneas, e conseqüentemente os processos de mineralização e nitrificação (NEILL et al., 1999).

2.3.4 Carbono e nitrogênio da biomassa microbiana

Verificou-se que as concentrações de C e de N imobilizados na biomassa microbiana durante a estação chuvosa foram maiores do que na seca (Tabela 3), semelhantemente ao observado para o C e o N da matéria orgânica do solo (Tabela 2).

Na estação chuvosa, para a camada superficial de solo (0-10 cm), o C microbiano variou entre 329 mg kg⁻¹ solo e 542 mg kg⁻¹ solo; enquanto o N microbiano esteve entre 44,8 mg kg⁻¹ solo e 62,5 mg kg⁻¹ solo, porém sem diferenças significativas. Durante a estação seca, os teores de C e N dos microrganismos estiveram entre 35,5 e 58 mg kg⁻¹ solo, e entre 6,3 mg kg⁻¹ solo e 8,9 mg kg⁻¹ solo, respectivamente. Contudo as concentrações desses elementos foram similares ao longo da sequência. A relação C/N variou de 4,7 (capoeira – estação seca) a 8,7 (pastagem – estação das chuvas).

De acordo com os dados da Tabela 3, ocorreu uma flutuação sazonal da biomassa microbiana relacionada diretamente ao teor de umidade do solo, conforme já observado anteriormente por Feigl, (1995) e Fernandes, (1999) nos solos da Nova Vida. A elevada umidade da região amazônica (Tabela 1) exerce efeito duplo: estimula o crescimento dos microrganismos, levando a maior imobilização de nutrientes e acelera a velocidade de decomposição da serapilheira superficial (BIJAYALAXMI DEVI; YADAVA, 2006).

Tabela 3 - Carbono e nitrogênio microbianos (mg kg^{-1} solo) e relações Cmic:Corg, Nmic:Norg e C/N, em porcentagem, entre parênteses, em amostras de solo durante as estações chuvosa e seca

Uso da terra	Carbono	Nitrogênio	Cmic:Corg	Nmic:Norg	C/N
	----- mg kg^{-1} solo seco -----		----- % -----		
Estação chuvosa					
Floresta	329,0 ^{B*} \pm 88,3	44,8 ^A \pm 15,8	2,3 ^A \pm 0,5	3,6 ^A \pm 1,7	7,3 ^A \pm 2,7
Pastagem	542,0 ^A \pm 158,5	62,5 ^A \pm 15,7	2,0 ^A \pm 0,5	3,3 ^A \pm 0,9	8,7 ^A \pm 2,5
Capoeira	340,4 ^B \pm 114,0	46,8 ^A \pm 19,6	1,9 ^A \pm 0,7	3,0 ^A \pm 1,5	7,3 ^A \pm 5,1
Estação seca					
Floresta	58,0 ^A \pm 38,9	8,0 ^A \pm 2,4	0,5 ^A \pm 0,3	1,0 ^A \pm 0,3	7,2 ^A \pm 3,1
Pastagem	35,5 ^A \pm 17,3	6,3 ^A \pm 2,5	0,2 ^B \pm 0,1	0,5 ^B \pm 0,2	5,6 ^A \pm 3,0
Capoeira	42,2 ^A \pm 11,9	8,9 ^A \pm 2,3	0,4 ^{AB} \pm 0,1	1,1 ^A \pm 0,4	4,7 ^A \pm 1,0

*Médias seguidas de mesma letra dentro de uma época, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O C microbiano aumentou pelo menos 64% no processo de mudança de uso da terra para pastagem, como conseqüência do rápido crescimento e intensa atividade radicular da *Brachiaria brizantha* (FERNANDES, 1999). O tipo de manejo e as diferenças na qualidade da serapilheira de floresta e pastagens diferem marcadamente, variando de composição lenhosa, rica em lignina para um substrato mais celulósico e, portanto, facilmente decomponível pela microbiota do solo (OHTONEN et al., 1997; STEVENSON et al., 2004). Os teores de C microbiano quantificado nas amostras sob floresta nativa e capoeira não diferiram entre si, seguindo a mesma tendência dos teores de C da MOS durante o período chuvoso. O nitrogênio microbiano não sofreu variações entre as áreas.

Durante o período seco, não houve diferenças no C e N microbianos ao longo da seqüência, devido à menor disponibilidade de matéria orgânica e água no solo. De acordo com Lynch e Panting (1980), a qualidade do substrato vegetal exerce influência

direta na redução da biomassa microbiana durante o período seco. Em condições de estresse hídrico, a atividade radicular é reduzida drasticamente e a composição dos exsudatos passa a ser constituída por resíduos mais complexos, limitando o crescimento microbiano.

A contribuição do C microbiano sobre o C orgânico total variou de 0,2 a 2,3, enquanto a proporção $N_{mic}:N_{org}$ esteve entre 0,5 a 3,3. Os menores valores foram encontrados na pastagem (estação seca) e os maiores na floresta (estação chuvosa). A participação do C e N microbianos na quantidade total de matéria orgânica foi maior durante a estação das chuvas, indicando que a alta umidade e temperatura estimularam o crescimento microbiano. Conseqüentemente houve maior imobilização de nutrientes. Não foram observadas diferenças significativas nas relações $C_{mic}:C_{org}$ e $N_{mic}:N_{org}$ entre as áreas. Os dados sugerem que ambos os sistemas, natural e alterado encontram-se em equilíbrio dinâmico (ANDERSON; DOMSCH, 1989). Estes índices são apontados por Insam et al. (1989) como indicadores do equilíbrio da ciclagem da MOS nos diferentes tipos de solo e sistemas de manejo.

Em ecossistemas estáveis como florestas tropicais, onde a entrada de C orgânico é similar às perdas na forma de CO_2 , a relação $C_{mic}:C_{org}$ torna-se linear e fica por volta de 2,5% (ANDERSON; DOMSCH, 1989). Os valores obtidos neste estudo estão próximos às variações encontradas para solos de florestas tropicais (1,5 – 5,3%; LUIZÃO et al., 1992) e temperadas (1,8 – 2,9%; VANCE et al., 1987).

Valores de $C_{mic}:C_{org}$ abaixo de 2,0 (conforme observado na estação seca) são críticos, pois refletem o efeito de mudanças ambientais severas sobre a microbiota do solo. Ainda assim, a floresta apresentou a maior relação $C_{mic}:C_{org}$, o que sugere que a biomassa microbiana nesses solos é mais ativa e a ciclagem do C mais eficiente. A capoeira apresentou maior valor de N_{mic} e de $N_{mic}:N_{org}$, embora diferenças significativas entre as áreas não foram observadas. De um modo geral, a contribuição do N microbiano em relação ao N total também foi baixa, quando comparada aos valores obtidos por outros autores (BROOKES et al., 1985; WILLIAMS; SPARLING, 1984). De acordo com Anderson (2003), as comunidades microbianas de solos submetidos à rotação de culturas são energeticamente mais eficientes, e apresentam taxas $C_{mic}:C_{org}$ e $N_{mic}:N_{org}$ mais elevadas, do que aquelas presentes em

monoculturas e solos de floresta. Sob as condições ácidas dos solos de floresta, os requerimentos necessários para a manutenção das células microbianas são maiores. Conseqüentemente, pouca biomassa é produzida, resultando assim em menores taxas Cmic:Corg e Nmic:Norg.

Cleveland et al. (2003) afirmam que há um gradiente de resposta da comunidade microbiana aos fatores ambientais, o qual é mais intenso em solos de baixa fertilidade natural, como os Oxissols e os Ultissols da região Amazônica brasileira. Fatores como umidade, temperatura, manejo e pH do solo são mais decisivos no crescimento e atividade dos microrganismos, do que o estoque de matéria orgânica. O uso agrícola de solos pouco férteis tem conseqüências mais profundas para a comunidade microbiana e para a ciclagem biogeoquímica dos nutrientes, do que o manejo de solos mais férteis.

2.3.5 Diversidade do Domínio *Bacteria*

A reação de amplificação com os primers eubacterianos 338f-GC e 518r gerou um único fragmento de 180 pb. Os amplicons foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (Figuras 14 e 16), e a análise de agrupamento hierárquico (Figuras 15 e 17) foi feita com base na presença ou ausência das bandas detectadas no gel de poliacrilamida. O índice de similaridade entre as áreas de estudo foi de 94%, para ambas as épocas de amostragem. Alguns conjuntos de amplicons, exemplificados de I a VI, foram escolhidos para melhor comparar as similaridades e/ou diferenças entre os padrões de bandejamento.

2.3.5.1 Estação das chuvas

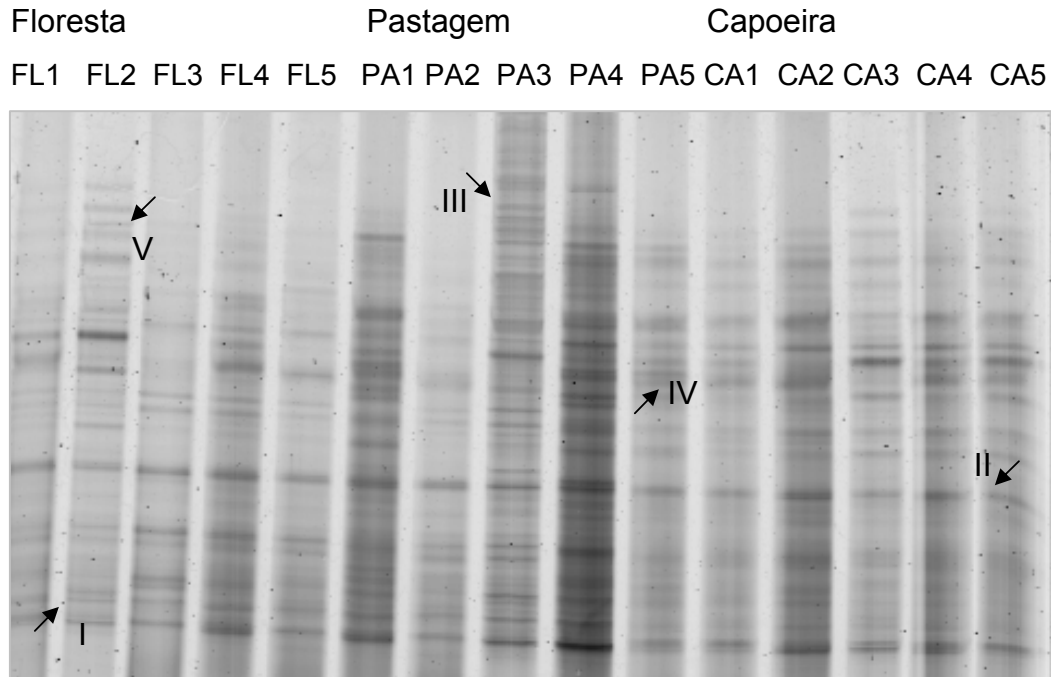


Figura 14 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante obtida a partir de PCR do gene ribossomal 16S de *Bacteria*, em amostras de solo coletadas na estação chuvosa, na Fazenda Nova Vida

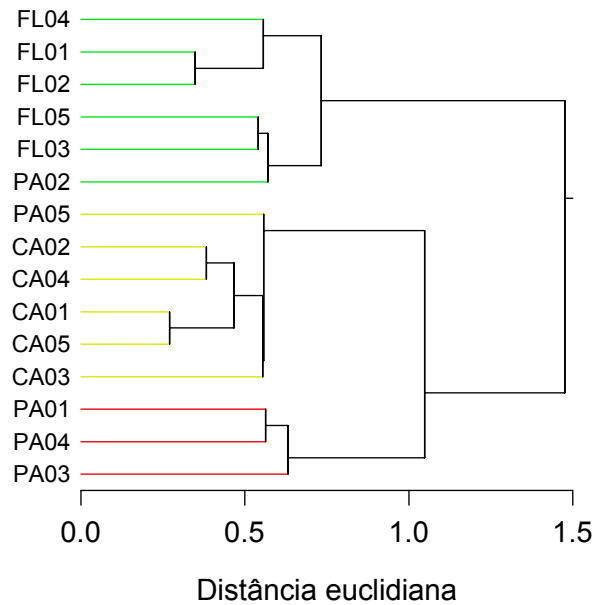


Figura 15 - Dendrograma do Domínio *Bacteria* para amostras de solo coletadas durante a estação chuvosa, na Fazenda Nova Vida

A Figura 14 mostra conjuntos de bandas presentes em todas as amostras de solo (I, II), o que indica que estavam presentes no DNA extraído de cada amostra e também a presença das mesmas populações bacterianas nas diferentes áreas. A pastagem foi caracterizada pela presença de padrões de bandas concentrados nas repetições PA3 e PA4 (III), enquanto um perfil único (IV) foi encontrado nas amostras de capoeira e na repetição PA5. As amostras de floresta apresentaram alta variabilidade de padrões de bandeamento, porém a repetição FL2 apresentou mais bandas do que as demais (V). O agrupamento hierárquico separou as comunidades de *Bacteria* em três clusters distintos (Figura 15), exceto PA2 que agrupou com as repetições de floresta e PA5 que esteve mais próxima ao cluster da área de capoeira.

2.3.5.2 Estação seca

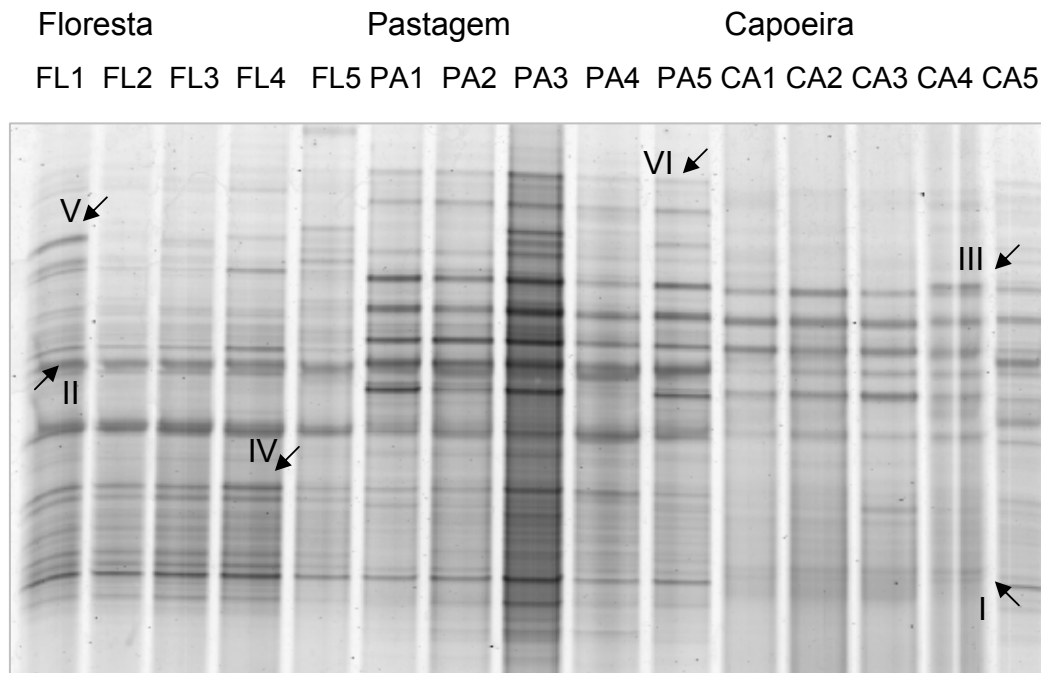


Figura 16 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante obtida a partir de PCR do gene ribossomal 16S rDNA de *Bacteria*, em amostras de solo coletadas na estação seca, na Fazenda Nova Vida

O perfil de DGGE obtido para as amostras de solo durante a estação seca (Figura 16) revelou menor número de bandas por área, porém as diferenças na

estrutura bacteriana foram mais bem definidas do que na estação chuvosa. O conjunto de bandas representado por I e II esteve presente em quase todas as amostras, exceto para as repetições CA1 a CA4. O padrão de bandas II foi encontrado nas três áreas, entretanto a intensidade das bandas foi menor nas amostras de capoeira. O perfil III representou bandas comuns a pastagens e a capoeira, enquanto IV e V foram bandas específicas encontradas nas amostras de floresta e na repetição FL1, respectivamente. VI representou um perfil particular nas amostras de pastagem. Não foi encontrado um perfil de bandas específico ao sistema capoeira.

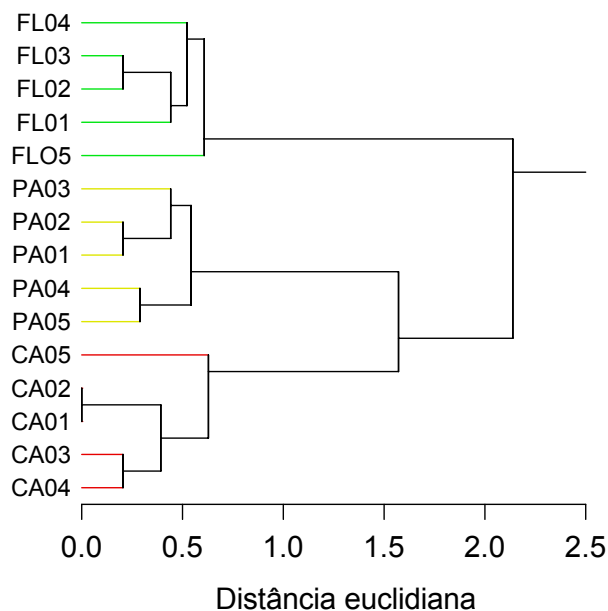


Figura 17 - Dendrograma do Domínio *Bacteria* para amostras de solo coletadas durante a estação seca, na Fazenda Nova Vida

A análise de clusters pôde distinguir completamente as comunidades bacterianas das áreas amostradas (Figura 17), ao contrário do padrão de bandejamento obtido para as amostras da estação chuvosa (Figura 14), onde as amostras PA2 e PA5 agruparam com as repetições de floresta e capoeira, respectivamente (Figura 15). Apesar da biomassa microbiana não ter variado significativamente entre as áreas durante a estação seca (Tabela 3), a análise de clusters mostrou que a estrutura da comunidade de *Bacteria* é distinta.

Independentemente do período de amostragem, bandas similares foram encontradas em todas as amostras de solo. Os perfis de DGGE obtidos neste estudo revelaram variações entre as repetições tão elevadas, quanto entre tratamentos em áreas amplas de campo. A causa para essas variações está possivelmente relacionada ao efeito conjunto da cobertura vegetal e dos fatores químicos do solo sobre a diversidade de bactérias.

A abordagem molecular PCR-DGGE mostrou ser uma ferramenta eficiente para a caracterização e monitoramento de comunidades bacterianas diversas, focalizando em amplicons para os quais a ocorrência e/ou a frequência relativa são afetadas por variações ambientais (CLEGG, 2006). Os resultados obtidos indicam que a diversidade genética de *Bacteria* mudou na conversão do uso da terra para pastagem e posterior recuperação para capoeira.

2.3.6 Correlação entre a diversidade de *Bacteria* e variáveis ambientais

A Análise de Componentes Principais (PCA) é um método de ordenação que reduz a complexidade dos dados e representam-no num sistema de novas dimensões (eixos). Os resultados (Figuras 18 e 19) expressam a relação existente entre a mudança no uso da terra e os parâmetros químicos e microbiológicos do solo. Os eixos 1 e 2 puderam explicar 79,3 e 20,7% da variabilidade na estrutura das comunidades bacterianas durante a estação das chuvas, enquanto na estação seca os eixos 1 e 2 explicaram 81,7 e 18,3% da variabilidade.

2.3.6.1 Estação das chuvas

Segundo a estrutura da comunidade bacteriana na PCA, as amostras sob floresta se separam das de capoeira ao longo do eixo 1, enquanto as amostras de pastagem são intermediárias entre os dois usos da terra (Figura 18).

As amostras sob a cobertura florestal se relacionam a maiores valores de Al, NO_3^- , taxas de mineralização e de nitrificação e das relações Cmic:Corg e Nmic:Norg. A acidez potencial (H + Al) também foi maior na floresta nativa (Tabela 1), o que está de

acordo com o menor valor de pH nesses solos. Pode-se inferir que, possivelmente, a comunidade de bactérias desses solos seja composta predominantemente por espécies acidófilas. Em estudo realizado por Kim et al., 2007 os autores afirmam que o grupo *Acidobacterium* representou 50% da diversidade bacteriana amostrada em solos da floresta Amazônica, Estado de Rondônia.

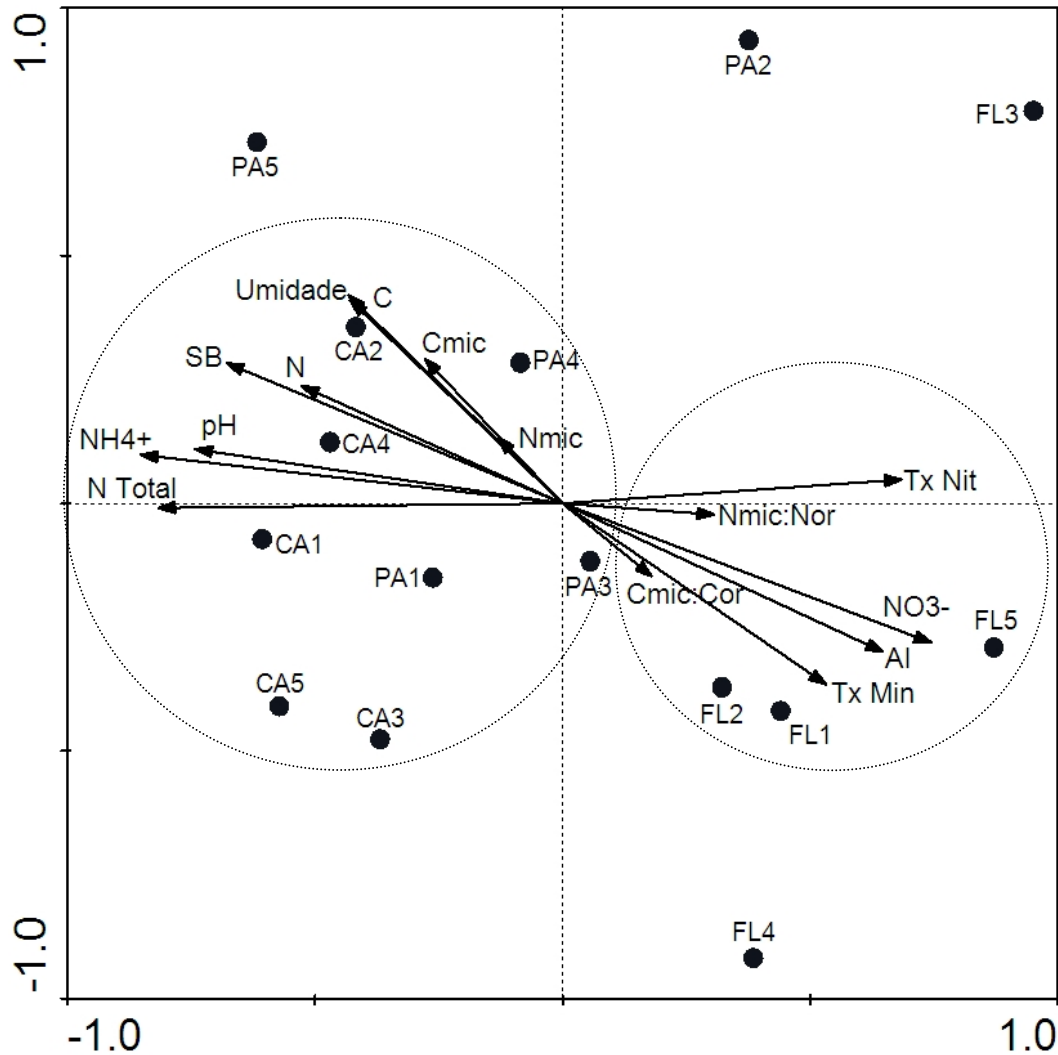


Figura 18 – Análise de componentes principais para amostras de solo coletadas nas áreas de floresta nativa, pastagem e capoeira durante a estação chuvosa na Fazenda Nova Vida

O nitrato correspondeu a 76% da forma de absorção de N mineral pela floresta (Figura 10). Em contraste, as baixas concentrações de NO_3^- na pastagem e na capoeira

podem estar relacionadas à presença de microssítios anaeróbios e à elevada atividade respiratória das raízes de gramíneas (CARMO et al., 2005). As maiores taxas de mineralização e de nitrificação sugerem rápida ciclagem da matéria orgânica da serapilheira. Dessa forma, a maior parte do N mineral é rapidamente nitrificada e a imobilização microbiana é normalmente baixa (NEILL et al., 2006). Os maiores valores das relações $C_{mic}:C_{org}$ e $N_{mic}:N_{org}$ nos solos sob floresta indicam que a porção ativa da matéria orgânica do solo, representada pela biomassa microbiana, é maior do que nos solos sob a cobertura de gramíneas.

De modo inverso, as amostras sob pastagem e capoeira apresentam maiores teores de pH, soma de bases (representada pela soma dos cátions Ca, Mg e K), umidade, C e N totais, biomassa microbiana, N mineral total e NH_4^+ . As amostras sob pastagem estão mais dispostas na região central do gráfico, porém foram mais influenciadas pelos fatores ambientais citados acima, aproximando-se com as amostras da área de capoeira. A substituição da floresta por uma monocultura de gramíneas eleva o pH do solo e dos cátions trocáveis devido à entrada de nutrientes via cinzas, e reduz o nível de acidez trocável ($P < 0,05$) (NEILL et al., 1997). As amostras sob pastagem e capoeira apresentaram maior teor de umidade na estação chuvosa, provavelmente ao efeito físico que gramíneas impõem ao solo. De um modo geral, os solos sob gramíneas retêm mais água, como consequência de aumentos na densidade e redução da porosidade total do solo (CERRI et al., 2005).

A conversão da terra para pastagens aumenta os estoques de C e N totais, pela elevada produção de biomassa vegetal e atividade rizosférica de gramíneas do gênero *Brachiaria* (CERRI et al., 2003; CERRI et al., 2004). Durante a época chuvosa, a atividade radicular aumenta significativamente as populações microbianas, especialmente na região rizosférica (STEVENSON et al., 2004). A composição vegetal de pastagens, caracterizada por um substrato mais celulósico e, portanto, facilmente decomponível, estimula o aumento do carbono microbiano nos solos sob esta cobertura vegetal (OHTONEN et al., 1997). Dessa forma, a elevada umidade da região amazônica (Tabela 1) estimula o crescimento microbiano levando à maior imobilização de nutrientes (BIJAYALAXMI DEVI; YADAVA, 2006).

Os estoques de N mineral foram maiores na capoeira, seguida pela pastagem. Desse total, 98% foram na forma amoniacal. Alguns autores afirmam que gramíneas, de um modo geral, apresentam altas taxas de crescimento e são eficientes na absorção de NH_4^+ (NEILL et al., 1999; GARCIA-MONTIEL et al., 2001).

2.3.6.2 Estação seca

Segundo a PCA, as comunidades bacterianas agruparam distintamente, de acordo com cada tipo de uso da terra (Figura 19).

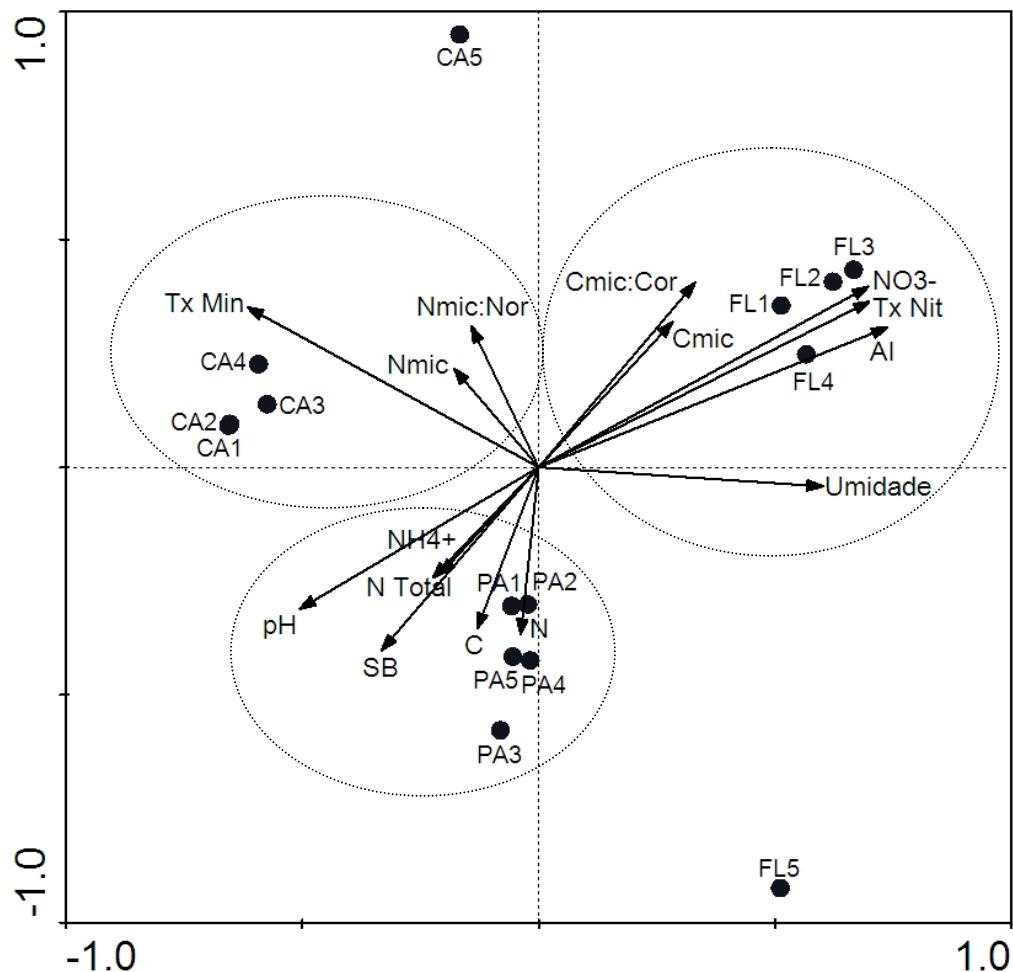


Figura 19 – Análise de componentes principais para amostras de solo coletadas nas áreas de floresta nativa, pastagem e capoeira durante a estação seca na Fazenda Nova Vida

Na estação seca, as amostras de floresta se relacionam positivamente aos teores de Al, umidade, NO_3^- , taxa de nitrificação, C_{mic} e a relação $\text{C}_{\text{mic}}:\text{C}_{\text{org}}$. Conforme observado também na estação chuvosa, a concentração de Al foi alta na floresta, conseqüência do pH ácido desses solos. A produção de nitrato e a taxa de nitrificação foram muito baixas na floresta, quando comparadas à estação chuvosa, entretanto estes parâmetros puderam explicar a diferenciação da floresta, em relação aos demais sistemas de uso da terra. As áreas de estudo sofreram redução acentuada de umidade entre os dois períodos de amostragem, porém na floresta a oscilação foi menor. O C_{mic} e a relação $\text{C}_{\text{mic}}:\text{C}_{\text{org}}$ influenciaram indiretamente, mas representam, como na estação chuvosa, a participação mais ativa dos microrganismos na ciclagem da serapilheira superficial na floresta (DIAZ-RAVINA et al., 1995).

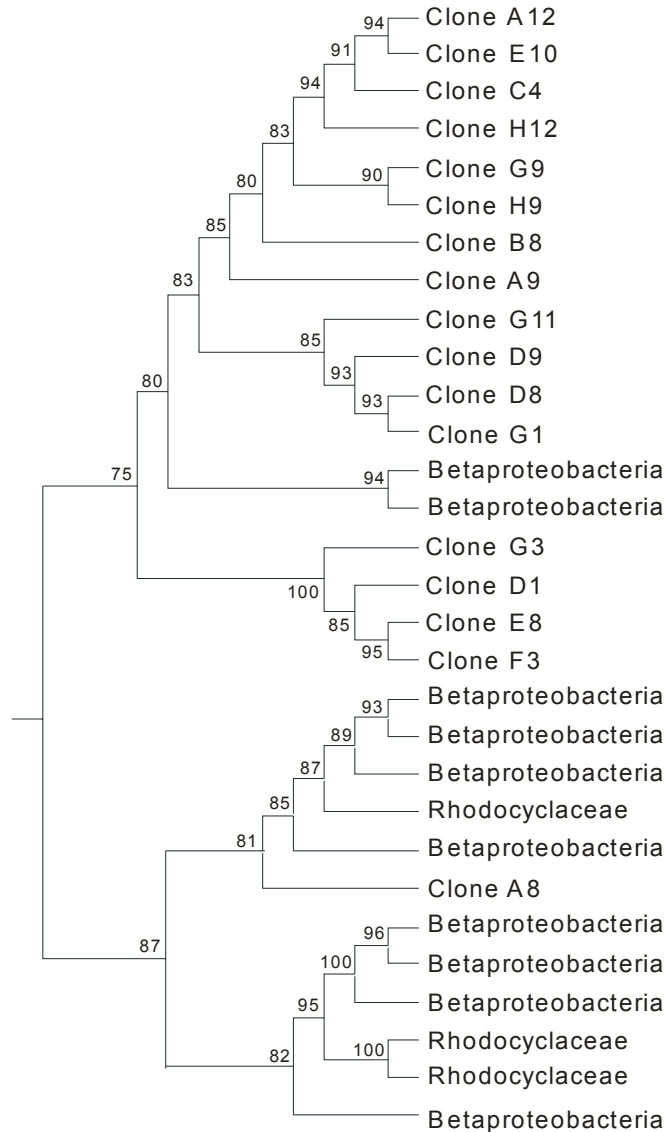
As amostras sob pastagem se relacionam a valores mais elevados de pH, SB, N mineral total, NH_4^+ , C e N totais. Comparando-se as estações chuvosa e seca, o pH não decresceu na pastagem, assim como as concentrações dos cátions trocáveis, representada por SB (Tabela 1). A quantidade de N mineral foi maior na pastagem, representada predominantemente pelo amônio (Figura 11). Na Fazenda Nova Vida, os maiores conteúdos de C e N orgânico totais se mantêm durante os períodos chuvoso e seco (Tabela 2). A relação próxima do C ao NH_4^+ evidencia que a existência de um suprimento adequado de C lábil proveniente da matéria orgânica do solo ou dos exsudatos de raízes, pode estimular a ciclagem microbiana do N e conseqüentemente, maior produção de N em forma amoniacal (CARMO et al., 2005).

Na área de capoeira, a taxa de mineralização foi o parâmetro de influência mais direta, enquanto o N_{mic} e a relação $\text{N}_{\text{mic}}:\text{N}_{\text{org}}$ influenciaram indiretamente na estrutura da comunidade bacteriana, conforme observado pelo tamanho do vetor. Excepcionalmente, a taxa de mineralização foi maior na capoeira durante o período seco (Figura 13). Possivelmente a presença de gramíneas e de espécies lenhosas e herbáceas nessa área (FEIGL et al., 2006) estimulou a mineralização microbiana.

2.3.7 Diversidade genética das bactérias oxidadoras de amônio

A amplificação de fragmentos rDNA 16S do grupo de bactérias AOB gerou um fragmento de 465 pb (KOWALCHUK et al., 1997).

2.3.7.1 Estação das chuvas

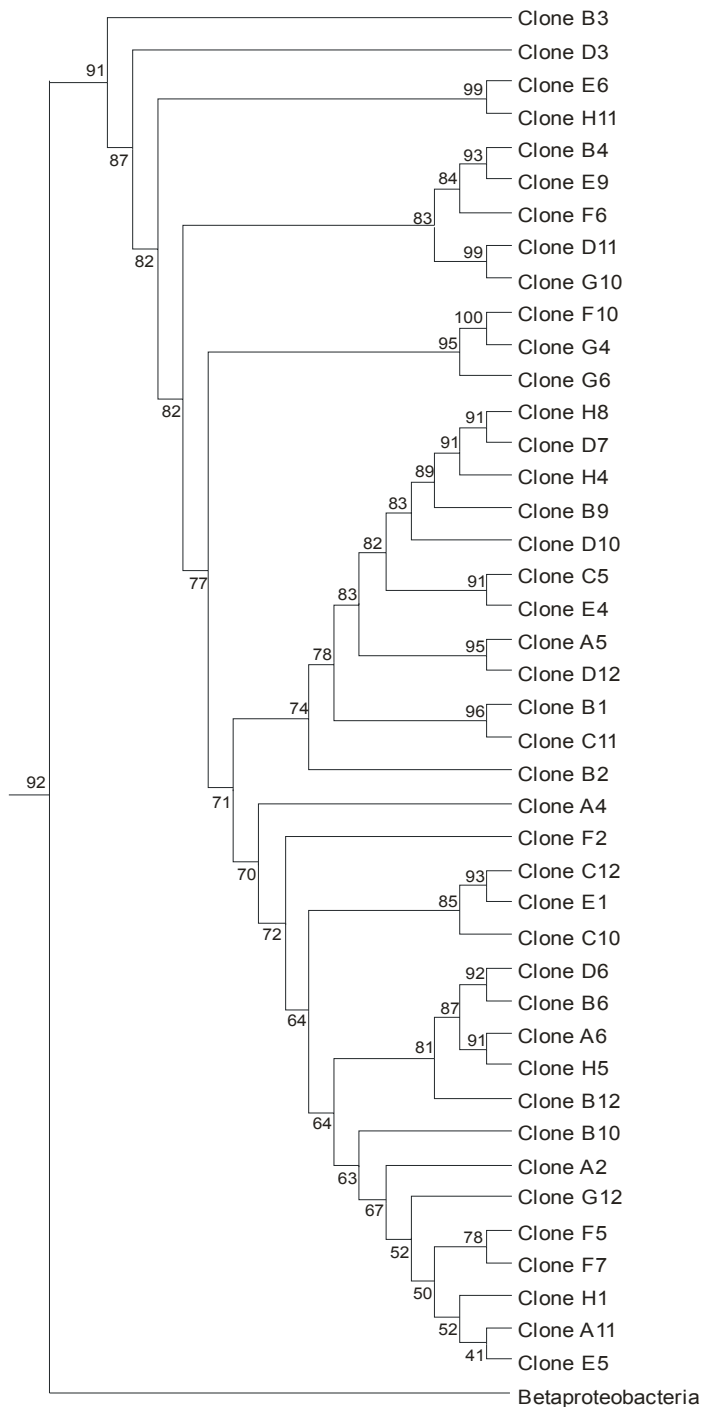


A

Continua

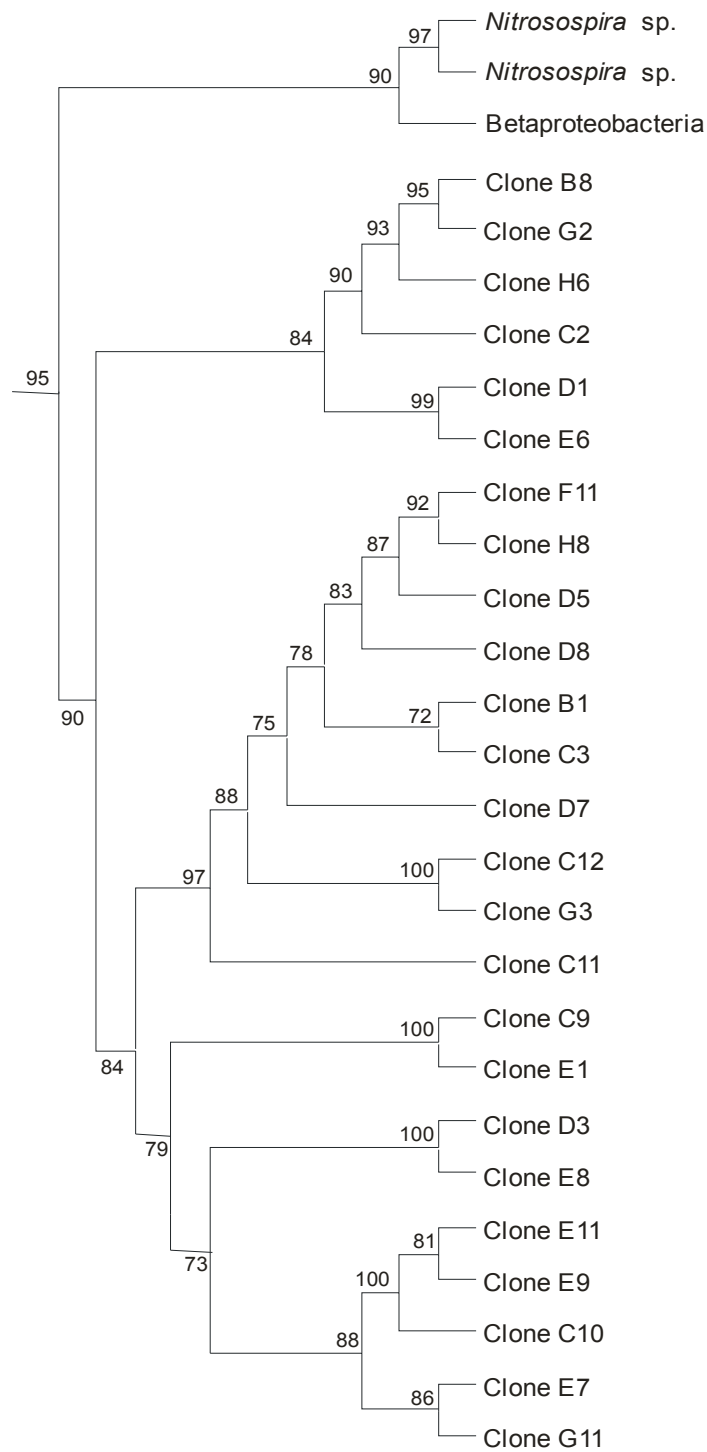
Figura 20A – Sequências de rDNA 16S de AOB, encontradas em solo de floresta durante a estação chuvosa - Fazenda Nova Vida. Árvore de distância evolutiva construída pelo algoritmo neighbor-joining. Os números em cada ramo indicam o valor de Bootstrap referente a 500 replicações. A. Dendrograma contendo os clones A12 – A8

Continuação



B

Figura 20B – Sequências de rDNA 16S de AOB, encontradas em solo de floresta durante a estação chuvosa - Fazenda Nova Vida. Árvore de distância evolutiva construída pelo algoritmo neighbor-joining. Os números em cada ramo indicam o valor de Bootstrap referente a 500 replicações. B. Dendrograma contendo os clones B3 – E5

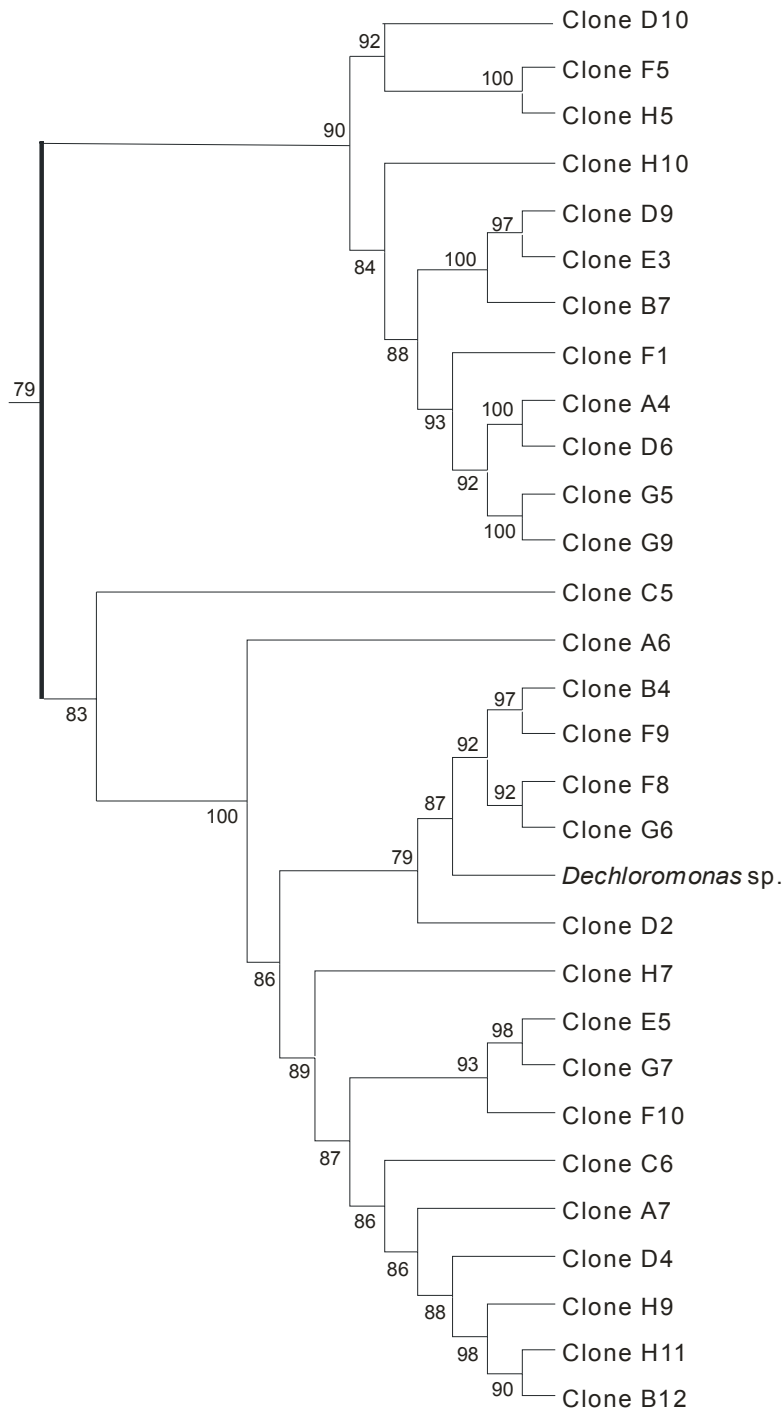


A

Continua

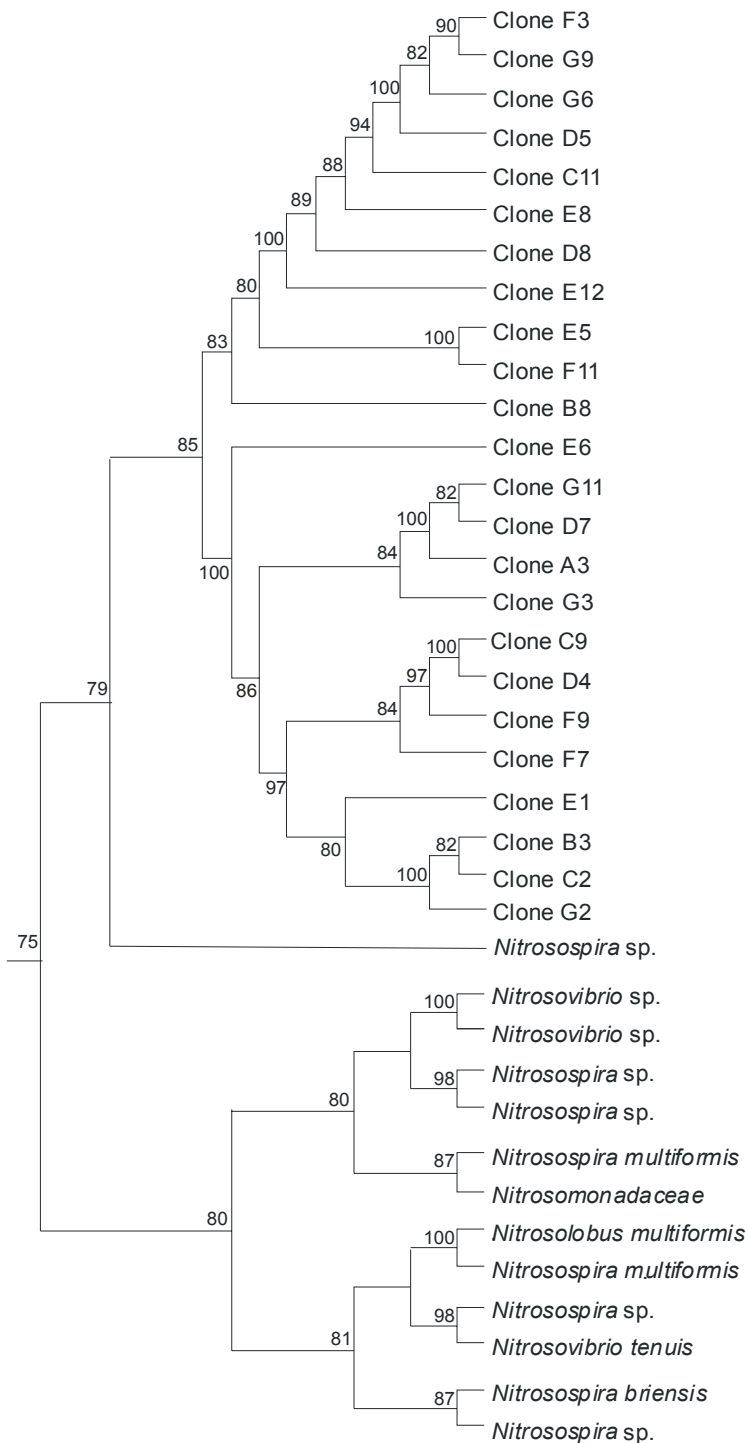
Figura 21 – Sequências de rDNA 16S de AOB, encontradas em solo de pastagem durante a estação chuvosa - Fazenda Nova Vida. Árvore de distância evolutiva construída pelo algoritmo neighbor-joining. Os números em cada ramo indicam o valor de Bootstrap referente a 500 replicações. A. Dendrograma contendo os clones B8 – G11

Continuação



B

Figura 21 – Sequências de rDNA 16S de AOB, encontradas em solo de pastagem durante a estação chuvosa - Fazenda Nova Vida. Árvore de distância evolutiva construída pelo algoritmo neighbor-joining. Os números em cada ramo indicam o valor de Bootstrap referente a 500 replicações. B. Dendrograma contendo os clones D10 – B12

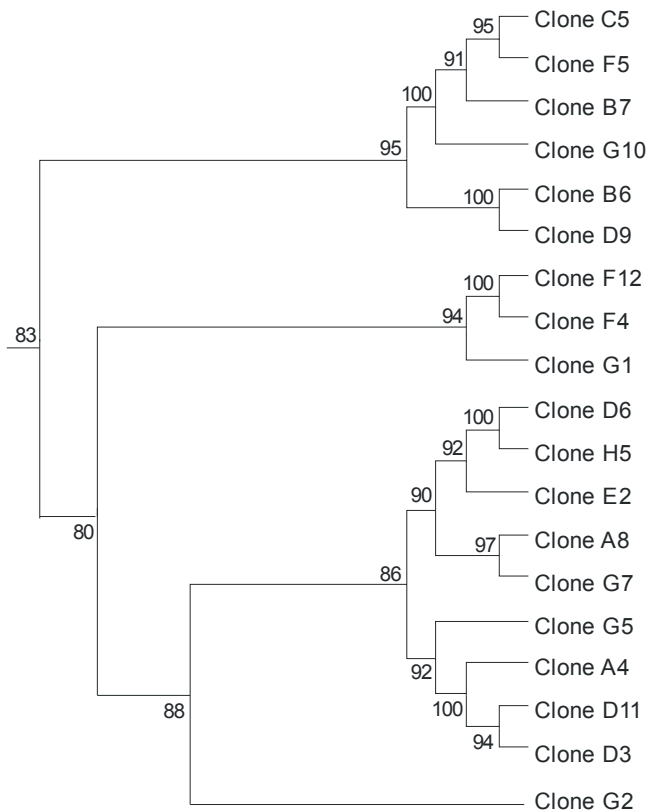


A

Continua

Figura 22 – Seqüências de rDNA 16S de AOB, encontradas em solo de capoeira durante a estação chuvosa - Fazenda Nova Vida. Árvore de distância evolutiva construída pelo algoritmo neighbor-joining. Os números em cada ramo indicam o valor de Bootstrap referente a 500 replicações. A. Dendrograma contendo os clones F3 – G2

Continuação



B

Figura 22 – Seqüências de rDNA 16S de AOB, encontradas em solo de capoeira durante a estação chuvosa - Fazenda Nova Vida. Árvore de distância evolutiva construída pelo algoritmo neighbor-joining. Os números em cada ramo indicam o valor de Bootstrap referente a 500 replicações. B. Dendrograma contendo os clones C5 – G2

Foram detectadas seqüências de betaproteobactérias não diretamente relacionadas ao grupo AOB, pertencentes às ordens Burkholderiales (famílias Rhodocyclaceae, Burkholderiaceae, Oxalobacteraceae e Comamonadaceae) e Neisserales (família Neisseraceae) (dados não mostrados) nas três áreas de estudo e em ambas as épocas de amostragem. Corroborando com os dados de Purkhold et al. 2000 e Nugroho et al. 2005, o conjunto de primers CTO apresentou uma baixa especificidade na identificação da família Nitrosomonadaceae.

Na região de floresta nativa, a análise de distância mostrou que os clones A12 – F3 se agrupam com seqüências da família Rhodocyclaceae (Figura 20A), e os clones B3 – E5 com Betaproteobacteria (Figura 20B). O solo sob pastagem continha um conjunto de clones B8 - G11 associados às seqüências de *Nitrosospira* sp. (bootstrap

83%) (Figura 21A). Uma seqüência de *Dechloromonas* sp. (família Rhodocyclaceae) agrupou com os clones B2 – D4 no segundo cluster da árvore filogenética (Figura 21B). Os clones foram separados em clusters distintos, indicando que os conjuntos são filogeneticamente próximos às famílias Nitrosomonadaceae e Rhodocyclaceae.

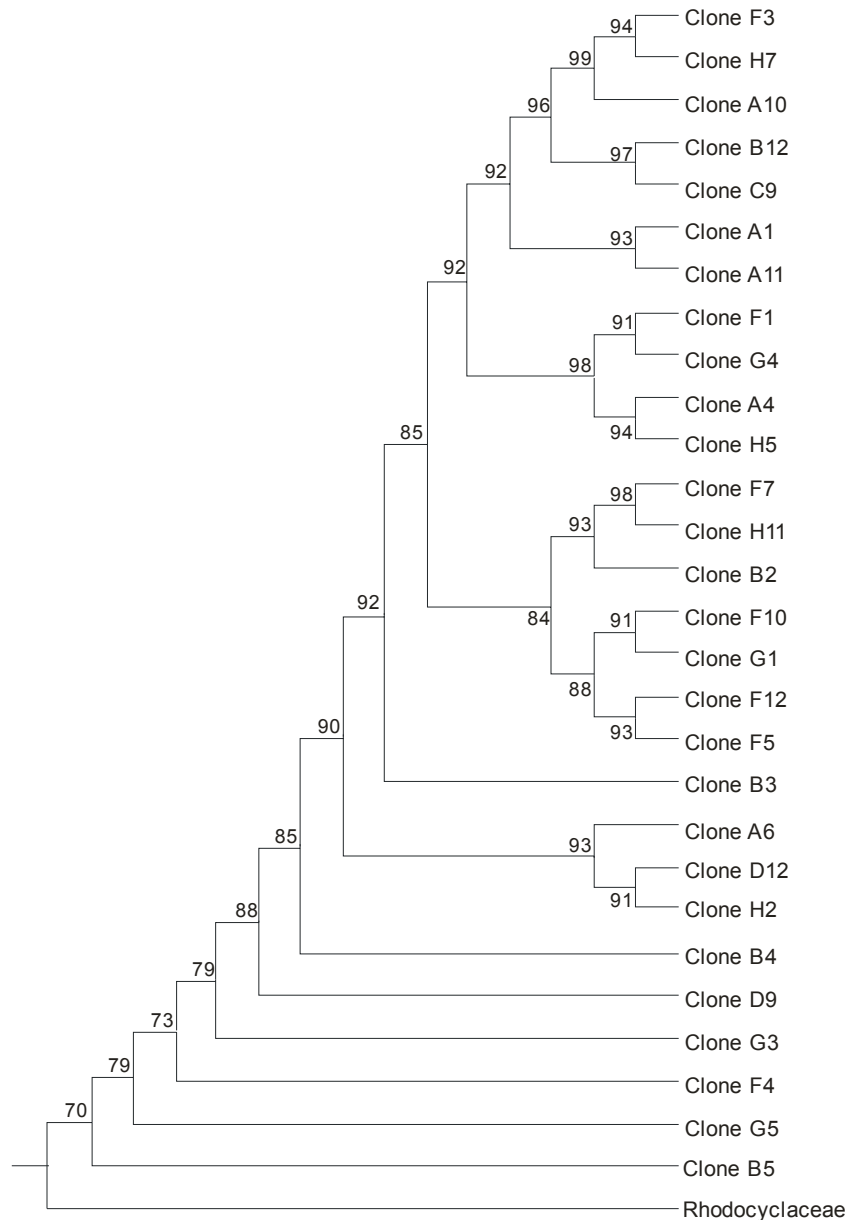
Na área de capoeira, os clones F3 – G2 (Figura 22A) se associaram a um ramo de *Nitrosospira* sp. e a um cluster maior contendo as seqüências de *Nitrosospira* sp., *Nitrosospira multiformis*, *Nitrosospira briensis*, *Nitrosovibrio* sp., *Nitrosovibrio tenuis*, *Nitrosolobus multiformis* e uma seqüência da família Nitrosomonadaceae (amostra ambiental). A presença de várias espécies do gênero *Nitrosospira* e *Nitrosovibrio* confirma a ubiquidade desses gêneros em solos (WEBSTER et al., 2002; JORDAN et al., 2005). O conjunto de clones C5 – G2 (Figura 22B) esteve mais próximo de Rhodocyclaceae.

A taxa de nitrificação foi maior na floresta do que nos demais sistemas de uso da terra (Figura 12). Em comparação com os valores obtidos por Nugroho et al., 2005 em solo de floresta de *Pinus* sp. ($30 \mu\text{g N g}^{-1}$ solo seco semana⁻¹), os $2,14 \mu\text{g N g}^{-1}$ solo seco semana⁻¹ da floresta foi baixo. Nugroho et al., 2007 observaram que o pH do solo é um fator de seleção de bactérias nitrificadoras. Sob pH muito ácido (em torno de 3,9 ou 4,0), as bactérias oxidadoras de amônio não são capazes de manter um pH intracelular elevado. Consequentemente, a atividade da enzima monooxigenase não é suficiente para manter a viabilidade dessas bactérias no solo. Neste estudo, não foram encontradas bactérias do grupo AOB na floresta.

O aumento do pH decorrente da queimada da floresta e o teor de NH_4^+ elevado propiciaram o surgimento de espécies do gênero *Nitrosospira* na pastagem (Figura 21A), e um aumento na diversidade de *Nitrosospira*, *Nitrosovibrio* e *Nitrosolobus* na capoeira (Figura 22A), sendo que nesta área a concentração de NH_4^+ foi mais elevada do que nas demais (Figura 10). Entretanto a taxa de nitrificação foi muito baixa na pastagem e na capoeira, em relação à floresta nativa (Figura 12). Gramíneas, como a braquiária e o capim-colonião, apresentam altas taxas de crescimento e são eficientes na absorção de NH_4^+ (NEILL et al., 1999; GARCIA-MONTIEL et al., 2001). A presença de bactérias AOB na pastagem e na capoeira mostra que as baixas taxas de nitrificação

estão relacionadas à elevada demanda de N mineral pelas gramíneas, o que resulta em sua rápida absorção pela planta e/ou imobilização microbiana.

2.3.7.2 Estação seca

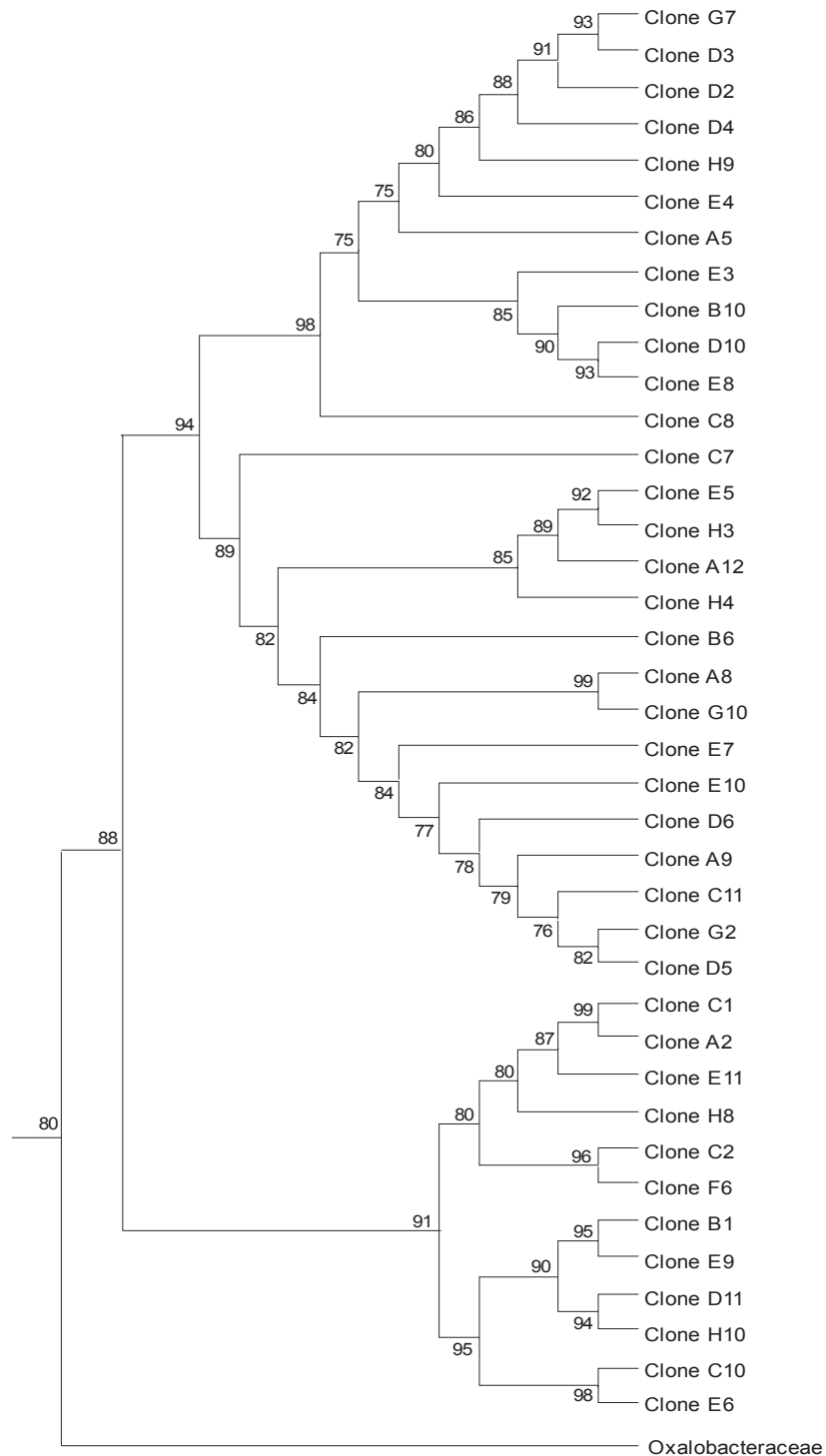


A

Continua

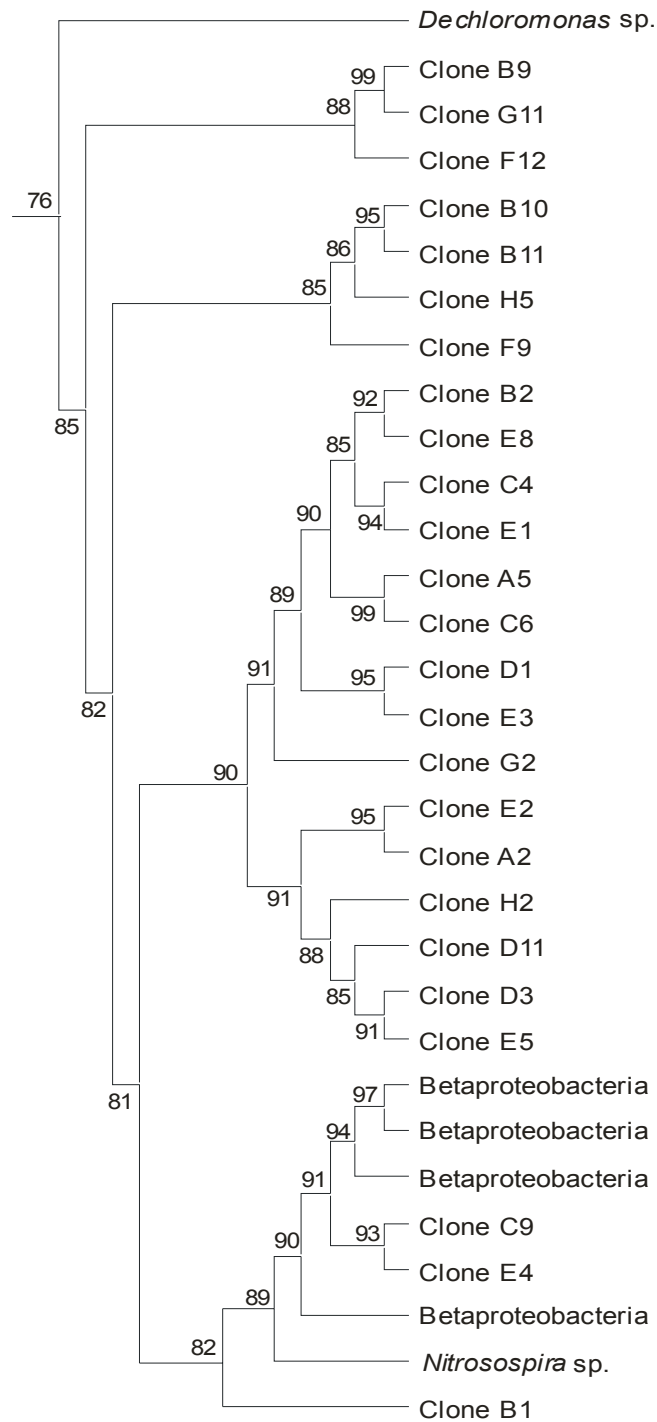
Figura 23 – Sequências de rDNA 16S de AOB, encontradas em solo de floresta durante a estação seca - Fazenda Nova Vida. Árvore de distância evolutiva construída pelo algoritmo neighbor-joining. Os números em cada ramo indicam o valor de Bootstrap referente a 500 replicações. A. Dendrograma contendo os clones F3 – B5

Continuação



B

Figura 23 – Seqüências de rDNA 16S de AOB, encontradas em solo de floresta durante a estação seca - Fazenda Nova Vida. Árvore de distância evolutiva construída pelo algoritmo neighbor-joining. Os números em cada ramo indicam o valor de Bootstrap referente a 500 replicações. B. Dendrograma contendo os clones G7 – E6

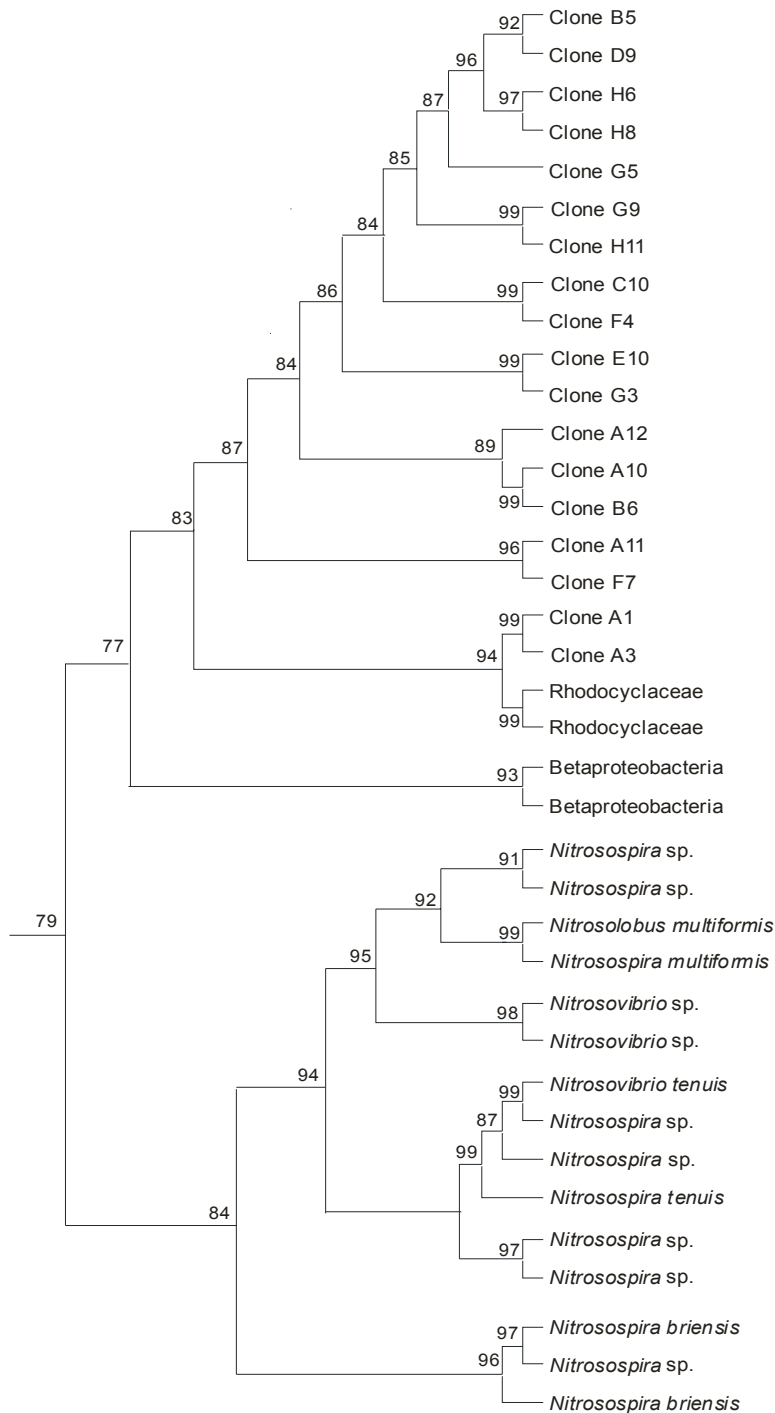


A

Continua

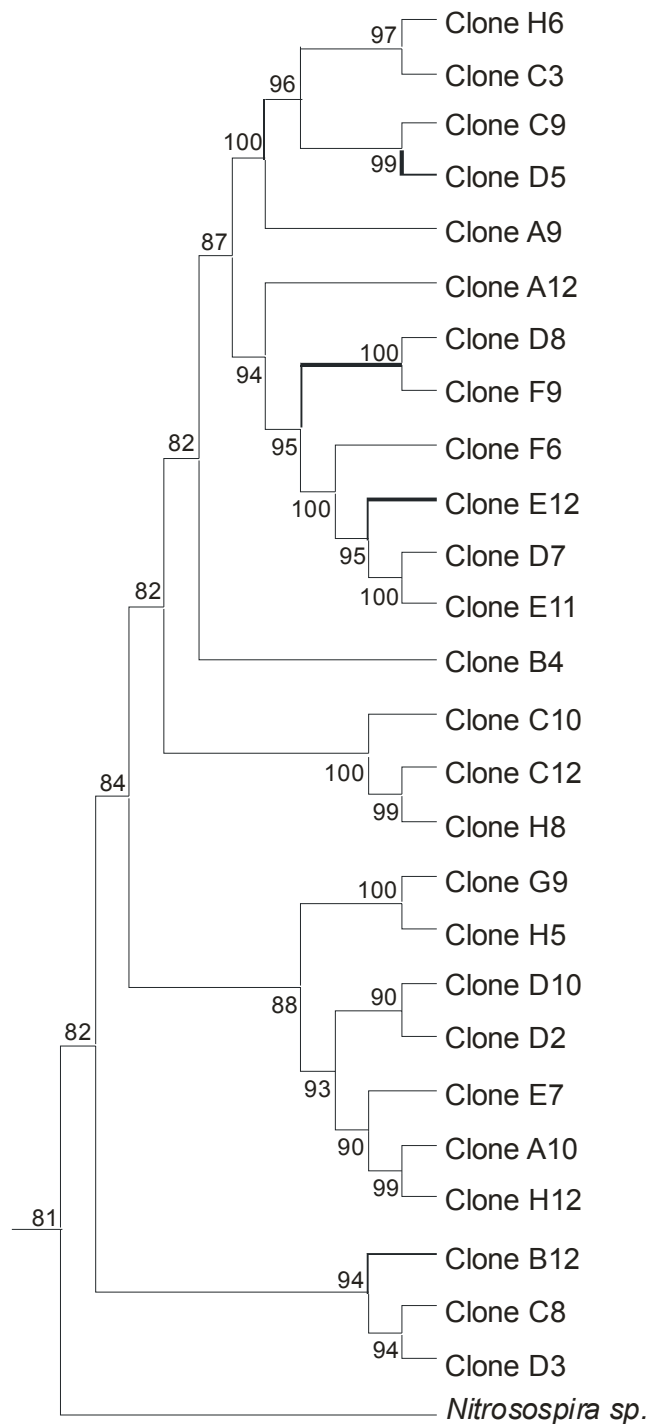
Figura 24 – Sequências de rDNA 16S de AOB, encontradas em solo de pastagem durante a estação seca - Fazenda Nova Vida. Árvore de distância evolutiva construída pelo algoritmo neighbor-joining. Os números em cada ramo indicam o valor de Bootstrap referente a 500 replicações. A. Dendrograma contendo os clones B9 – B1

Continuação



B

Figura 24 – Seqüências de rDNA 16S de AOB, encontradas em solo de pastagem durante a estação seca - Fazenda Nova Vida. Árvore de distância evolutiva construída pelo algoritmo neighbor-joining. Os números em cada ramo indicam o valor de Bootstrap referente a 500 replicações. B. Dendrograma contendo os clones B5 – A3

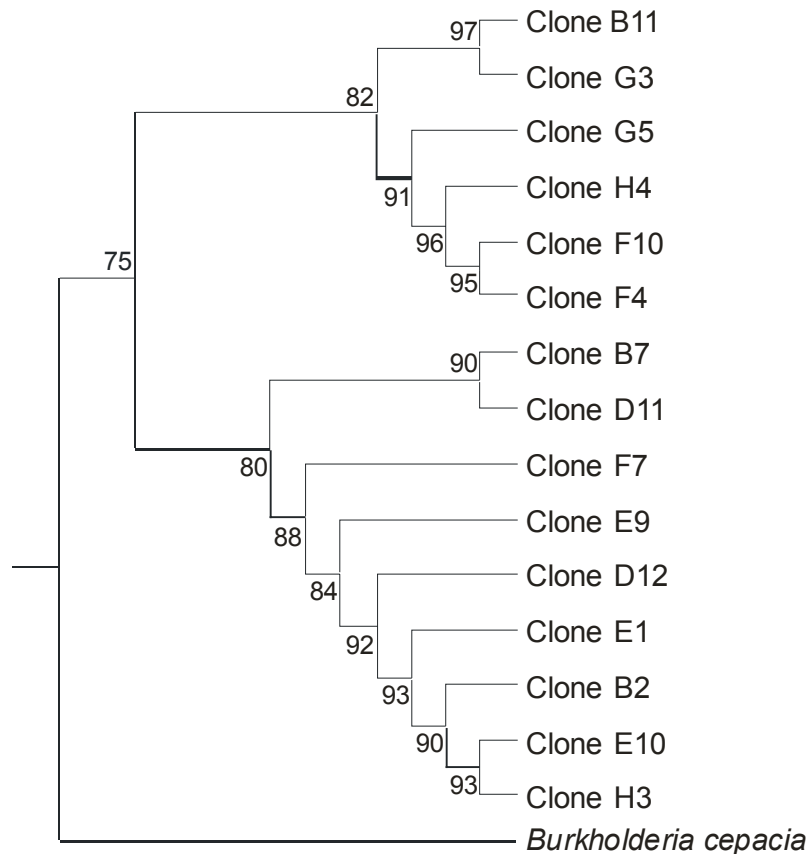


A

Continua

Figura 25 – Seqüências de rDNA 16S de AOB, encontradas em solo de capoeira durante a estação seca - Fazenda Nova Vida. Árvore de distância evolutiva construída pelo algoritmo neighbor-joining. Os números em cada ramo indicam o valor de Bootstrap referente a 500 replicações. A. Dendrograma contendo os clones H6 – D3

Continuação



B

Figura 25 – Seqüências de rDNA 16S de AOB, encontradas em solo de capoeira durante a estação seca - Fazenda Nova Vida. Árvore de distância evolutiva construída pelo algoritmo neighbor-joining. Os números em cada ramo indicam o valor de Bootstrap referente a 500 replicações. B. Dendrograma contendo os clones B11 – H3

De acordo com a Figura 23, os clones obtidos a partir do solo de floresta agruparam em dois grupos ou clados distintos: Grupo A: os clones F3 – B5 agruparam com amostras da família Rhodocyclaceae, e o Grupo B: clones G7 – E6 agruparam com seqüências da família Oxalobacteraceae. Conforme observado na estação chuvosa (Figura 20), não foram encontradas seqüências próximas à família Nitrosomonadaceae.

A distribuição de bactérias AOB é condicionada principalmente pelo pH do solo. Valores de pH ao redor de 4.0 inibem a atividade da enzima monooxigenase, conforme discutido anteriormente (item 2.3.7.1). Entretanto, há espécies do gênero *Nitrosospira*, (denominadas urease-positiva), que são capazes de crescer em solos com pH ao redor

de 4.0, na presença de um suprimento adequado de uréia. Uma hipótese é de que a uréia é absorvida para o interior da célula bacteriana e hidrolizada para NH_3 e CO_2 . Parte da amônia produzida é utilizada como fonte de energia e oxidada a nitrito, o qual é posteriormente utilizado pelas NOB para produção de nitrato (POMMERENING-ROSER; KOOPS, 2005). Em ambientes de floresta natural, as concentrações de uréia são normalmente muito baixas (μM) (JIANG; BAKKEN, 1989). Possivelmente a ausência das AOB em solos da floresta Amazônica seja limitada pelo efeito conjunto do pH e da baixa concentração de uréia no solo.

Além da nitrificação autotrófica feita pelas AOB, solos ácidos podem também suportar a atividade de nitrificadores heterotróficos. (PEDERSEN et al., 1999). Duggin et al., 1991 encontraram igual porcentagem de nitrificação heterotrófica e autotrófica em solos ácidos de floresta de *Pinus* sp. Em contraste, Pedersen et al., 1999 obtiveram predominância da nitrificação heterotrófica em uma floresta de coníferas. Schimel et al., 1984 observaram que o amônio não foi o principal substrato para a nitrificação autotrófica em solos ácidos de floresta, mas compostos orgânicos ricos em nitrogênio, indicando que a nitrificação heterotrófica foi predominante sobre a autotrófica. A ausência de bactérias nitritadoras na floresta sugere que a nitrificação heterotrófica possa estar ocorrendo nesses solos.

No solo sob pastagem (Figura 24A), os clones A1 e A3 se agruparam às amostras da família Rhodocyclaceae (não identificadas). Seqüências de Betaproteobacteria se relacionam proximamente com as seqüências dos clones, enquanto as espécies da família Nitrosomonadaceae (Figura 24B) encontradas foram: *Nitrosospira* sp., *Nitrosospira multiformis*, *Nitrosospira tenuis*, *Nitrosospira briensis*, *Nitrosovibrio* sp., *Nitrosovibrio tenuis* e *Nitrosolobus multiformis*. Durante a estação seca, a pastagem produziu $6,7 \mu\text{g N g}^{-1}$ solo seco de amônio (Figura 11), quantidade significativamente maior do que nas demais áreas. O elevado teor de NH_4^+ aumentou a diversidade de bactérias AOB, conforme observado também no solo de capoeira durante a estação chuvosa (Figura 22).

Na área de capoeira apenas uma seqüência de *Nitrosospira* sp. foi encontrada associada aos clones H6 – D3 (Figura 25A) enquanto o segundo conjunto B11 – H3 esteve associado à uma seqüência de *Burkholderia cepacia* (Figura 25B). Nesta área,

os clones foram separados em duas famílias: Nitrosomonadaceae e Burkholderiaceae. Os resultados mostram que, em relação à estação chuvosa, ocorreu uma redução na diversidade das AOB no solo sob capoeira, devido possivelmente a menores quantidades de NH_4^+ produzidas no período seco (Figura 11).

Os resultados presentes permitem inferir que as baixas taxas de nitrificação obtidas nas áreas sob cobertura de gramíneas podem estar relacionadas a fatores químicos do solo, que não a diversidade das AOB. Outra explicação seria a imediata imobilização do NO_3^- eventualmente formado.

2.3.8 Diversidade genética das bactérias oxidadoras de nitrito

Os dendrogramas foram construídos a partir de seqüências rDNA 16S para o grupo NOB, utilizando-se o algoritmo neighbor joining. Não houve amplificação para as amostras coletadas durante a estação seca, possivelmente pelo número insuficiente de cópias do produto de PCR, durante a reação de amplificação (397 pb) (DEGRANGE; BARDIN, 1995).

Foram encontradas várias seqüências da família Bradyrhizobiaceae (dados não mostrados). Análises de filogenia baseadas na região ribossomal 16S mostram que o clado de *Nitrobacter* é geneticamente relacionado às espécies *Bradyrhizobium japonicum* e *Rhodopseudomonas palustris* (HOVANEC et al., 1998).

Na floresta, foi encontrada apenas uma seqüência próxima à espécie *Nitrobacter* sp. (bootstrap 73%) (Figura 26). Apesar da maior taxa de nitrificação nesta área, a presença de uma única espécie sugere que os fatores químicos que influenciam a diversidade das AOB, tais como pH ácido, teor de N orgânico e/ou o mineral (NUGROHO et al., 2005; NUGROHO et al., 2007) estariam limitando a diversidade das NOB nos solos Amazônicos. Ainda assim, há produção de nitrato (Figuras 10 e 12), o que indica a atividade de nitratores na floresta.

2.3.8.1 Estação das chuvas

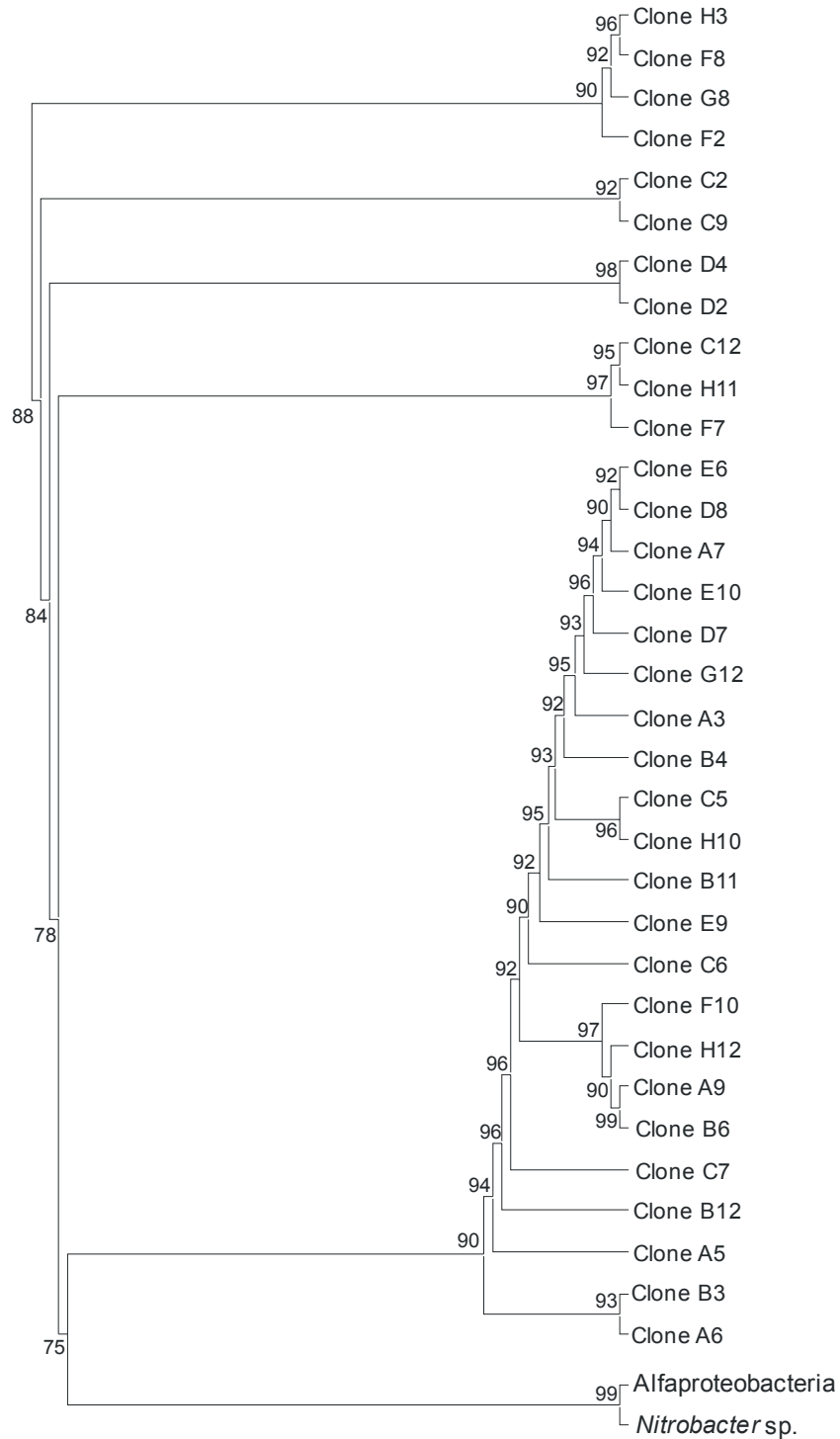


Figura 26 – Seqüências de rDNA 16S de NOB, encontradas em solo de floresta durante a estação chuvosa - Fazenda Nova Vida. Árvore de distância evolutiva construída pelo algoritmo neighbor-joining. Os números em cada ramo indicam o valor de Bootstrap referente a 500 replicações

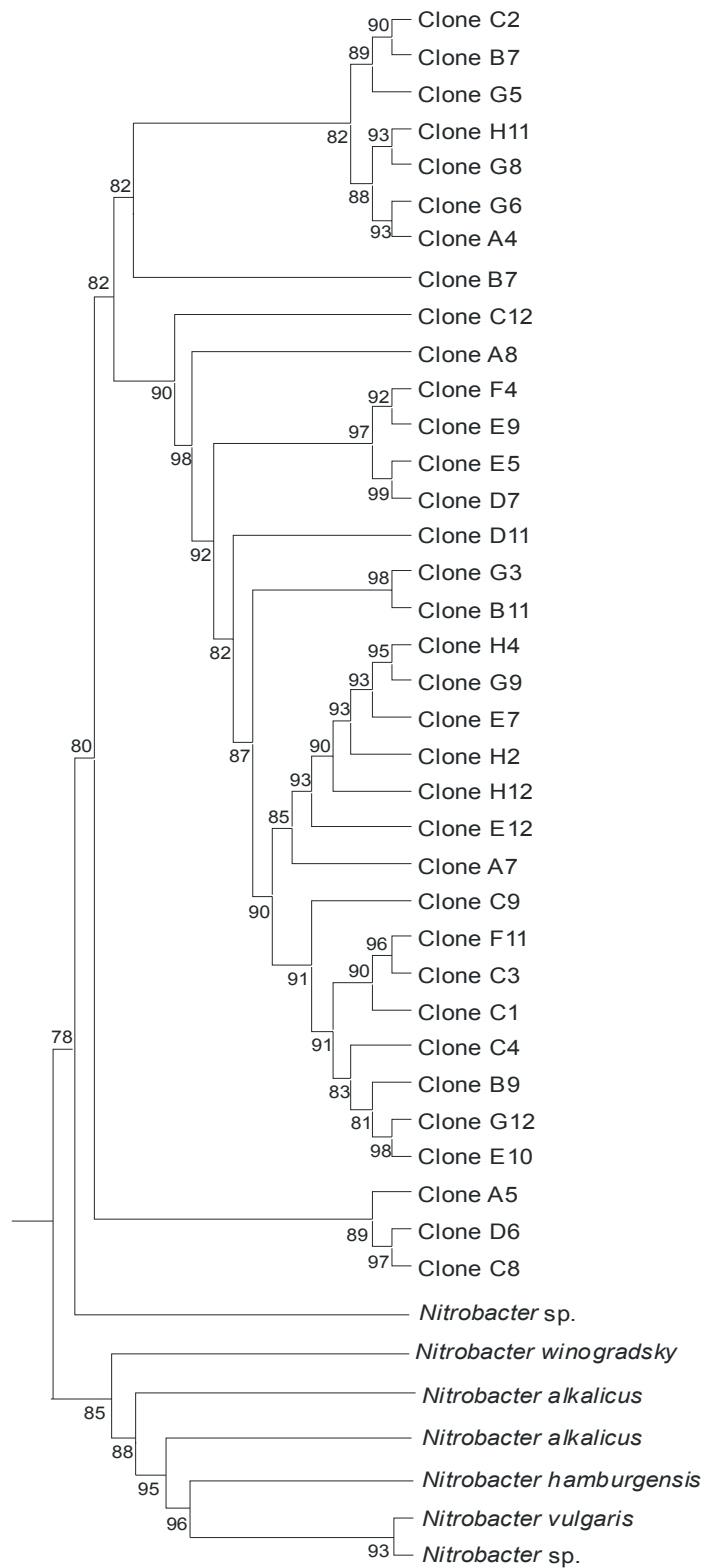


Figura 27 – Sequências de rDNA 16S de NOB, encontradas em solo de pastagem durante a estação chuvosa - Fazenda Nova Vida. Árvore de distância evolutiva construída pelo algoritmo neighbor-joining. Os números em cada ramo indicam o valor de Bootstrap referente a 500 replicações



Figura 28 – Seqüências de rDNA 16S de NOB, encontradas em solo de capoeira durante a estação chuvosa - Fazenda Nova Vida. Árvore de distância evolutiva construída pelo algoritmo neighbor-joining. Os números em cada ramo indicam o valor de Bootstrap referente a 500 replicações

Na área de pastagem (Figura 27), houve um aumento na diversidade do gênero *Nitrobacter*, onde foram encontradas as espécies: *Nitrobacter* sp., *Nitrobacter winogradsky*, *Nitrobacter alkalicus*, *Nitrobacter hamburgensis* e *Nitrobacter vulgaris* (bootstrap 76%). Houve uma redução na diversidade das NOB na capoeira (Figura 28), em relação à pastagem, onde somente as espécies *Nitrobacter* sp. e *Nitrobacter hamburgensis* foram encontradas.

A implantação de pastagens promove aumentos nos conteúdos de N orgânico, devido à atividade rizosférica de gramíneas e à fixação biológica do N₂ atmosférico por bactérias de vida livre (PICOLLO et al., 1996). Freitag et al. 2005 afirmam que solos com maior teor de N orgânico favorecem o aumento da diversidade de oxidadores de nitrito, especialmente dos gêneros *Nitrospira* e *Nitrobacter*. Porém, o aumento na diversidade do gênero *Nitrobacter* nos sistemas de pastagem e capoeira não resultou em maiores taxas de nitrificação.

Não existem dados na literatura relatando a presença e atividade das bactérias relacionadas ao ciclo da nitrificação, em solos da Amazônia. Dessa forma, os resultados desta pesquisa são inéditos e representam uma primeira amostragem da diversidade de bactérias nitrificadoras nesses solos, bem como ao longo de uma sequência floresta-pastagem-capoeira.

2.4 Considerações finais

Poucos trabalhos de pesquisa têm se ocupado em avaliar as relações benéficas entre a diversidade microbiana, qualidade do solo e sustentabilidade do ecossistema. A população microbiana e suas respostas a fatores de estresse têm sido tradicionalmente estudadas em nível de processos, número total de microrganismos, biomassa, taxas de respiração e atividade enzimática, porém com pouca atenção para as respostas relativas à estruturação da comunidade.

Borneman e Triplet (1997) apresentaram uma primeira descrição da diversidade microbiana dos solos da Amazônia baseada em métodos moleculares, e revelaram as primeiras evidências da profunda alteração da população microbiana associada com o desmatamento. Mais recentemente, Kim et al., 2007 realizaram uma análise descritiva dos principais grupos de bactérias em solos da floresta nativa e em sítios antropogênicos de terra preta. Os filos encontrados pelos autores nos solos da floresta nativa foram: Proteobacteria, Actinobacteria, Planctomyces, Verrumicomicrobia e Acidobacteria, este último correspondendo a 50% da diversidade total. Portanto, o pH é um fator de seleção para as bactérias nitrificadoras nos solos da floresta tropical Amazônica.

A proposta de identificar os grupos de bactérias responsáveis pelas etapas da nitrificação (AOB) e nitratação (NOB) do ciclo do N no ecossistema nativo e após a mudança de uso da terra deste estudo, teve resultados inesperados. Não foram encontradas seqüências de bactérias nitrificadoras nos solos da floresta, provavelmente devido à ação limitante do pH sobre esse grupo. Entretanto, a nitrificação ocorre nesses solos, indicando que outros grupos bacterianos realizam a função. Nos solos de pastagem, ocorre o processo inverso: as bactérias nitrificadoras estão presentes, mas as taxas de nitrificação são baixas, o que sugere uma rápida imobilização do NO_3^- eventualmente formado. Os resultados ilustram a redundância de funções da microbiota do solo, e enfatizam a importância de se investigar a ecologia das bactérias responsáveis pelo processo de nitrificação. Informações mais precisas permitirão prever o efeito das mudanças do uso da terra sobre a ciclagem biogeoquímica do N, elemento essencial para a produtividade florestal e agrícola.

3 CONCLUSÕES

- A conversão da floresta nativa para pastagem favorece de um modo geral, o aumento da biomassa microbiana e a diversidade geral de bactérias. Alterações significativas de diversas propriedades químicas do solo, principalmente a elevação do pH, e o aumento dos teores de N total e mineral decorrentes da mudança no uso da terra, parecem ser as causas principais.
- Embora existam amplicons comuns aos três sistemas de uso da terra, a estrutura da comunidade *Bacteria* é distinta em cada uma delas.
- No solo sob floresta, apesar do N mineral ser encontrado nas formas de NH_4^+ e NO_3^- e a taxa de nitrificação ter sido quantificada, não foram encontrados os gêneros de bactérias AOB. Esta é uma evidência de que neste ecossistema a nitrificação seja realizada por bactérias heterotróficas.
- O aumento do pH associado ao maior teor de NH_4^+ nos solos sob pastagem e capoeira, determinaram o aumento de espécies de bactérias AOB (*Nitrospira*, *Nitrosolobus* e *Nitrosovibrio*) e NOB (*Nitrobacter* sp., *Nitrobacter winogradsky*, *Nitrobacter hamburgensis*, *Nitrobacter vulgaris* e *Nitrobacter alkalicus*).
- A disponibilidade de NH_4^+ e a maior diversidade de NOB nos solos sob pastagem e capoeira indicam que o processo de nitratação ocorre. Entretanto o NO_3^- formado é imediatamente imobilizado, de modo que seu teor no solo é mantido próximo a zero.
- O padrão de diversidade de bactérias do processo da nitrificação nos solos da floresta tropical Amazônica não está diretamente relacionado à abundância de espécies vegetais. Fatores químicos como o pH do solo e as concentrações de N orgânico e mineral são mais determinantes do que a cobertura vegetal. Os resultados ilustram a redundância de funções, como se supunha anteriormente, ocasionada pela versatilidade e plasticidade metabólica dos microrganismos.

REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ANDERSON, T-H. Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 98, p. 285-293, 2003.

ANDERSON, J. P. E.; DOMSCH, K. H. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 10, p. 215-221, 1978.

ANDERSON, T-H.; DOMSCH, K. H. Ratios of microbial biomass carbon to total organic carbon in arable soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 21, n° 4, p. 471-479, 1989.

ALVAREZ, R.; SANTANATOGLIA, O. J.; GARCIA, R. Effect of temperature on soil microbial biomass and its metabolic quotient in situ under different tillage systems. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 19, p. 227-230, 1995.

ANDRÉN, O.; BENGTSSON, J.; CLARHOLM, M. Biodiversity and species redundancy among litter decomposers. In: Collins, H.P., Robertson, G.P., Klug, M.J. (Ed.). **The significance and regulation of soil biodiversity**. Dordrecht: 1995. chap. 4, p. 141 – 151.

Árvore filogenética baseada no 16S rRNA mostrando a afiliação das bactérias oxidadoras de amônio (verde) e as oxidadoras de nitrito (vermelho). Disponível em www.microbial-ecology.net/nitrifiers.asp. Acesso em : 10-05-2007.

AVRAHAMI, S.; CONRAD, R.; BRAKER, G. Effect of soil ammonium concentration on N₂O release and on the community structure of ammonia oxidizers and denitrifiers. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 68, p. 5685 - 5692, 2002.

BALL-COELHO, B.R.; ROY, R.C.; BRUIN, A.J. Nitrate leaching as affected by liquid swine manure and cover cropping in sandy soil of southwestern Ontario. **Canadian Journal of Soil Science**, Ontario, v. 84, n. 2, p. 187-197, 2004.

BASTOS, T.; DINIZ, T. D de A. S. Avaliação do clima do Estado de Rondônia para desenvolvimento agrícola. **Boletim de Pesquisa**, Belém, n. 44, p. 1 – 28, 1982.

BENSON, D. A.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D. J.; OSTELL, J.; WHEELER, D. L. GenBank. **Nucleic Acids Research**, New York, v. 33, D34-D38, 2005.

BIJAYALAXMI DEVI, N.; YADAVA, P. S. Seasonal dynamics in soil microbial biomass C, N and P in a mixed-oak forest ecosystem of Manipur, North-east India. **Applied Soil Ecology**, Berlin, v. 31, 220-227, 2006.

BODDEY, R. M.; MACEDO, R.; TARRÉ, R. M.; FERREIRA, E.; OLIVEIRA, O. C.; REZENDE, C. P.; CANTARUTTI, R. B.; PEREIRA, J. M.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Nitrogen cycling in *Brachiaria* pastures: the key to understanding the process of pasture decline. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Berlin, v. 103, p. 389-403, 2004.

BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E. W. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 63, n. 7, p. 2647-2653, 1997.

BROOKES, P. C.; KRAGT, J. F.; POWLSON, D. S.; JENKINSON, D. S. Chloroform fumigation and release of soil nitrogen: the effect of fumigation time and temperature. **Soil Biology and Biochemistry**, Berlin, v. 17, p. 831-835, 1985.

CARMO, J. B.; ANDRADE, C. A.; CERRI, C. C.; PICCOLO, M. C. Disponibilidade de nitrogênio e fluxos de N₂O a partir de solo sob pastagem após aplicação de herbicida. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 29, p. 735-746, 2005.

CARNEY, K. M.; MATSON, P. A.; BOHANNAN, B. J.M. Diversity and composition of tropical soil nitrifiers across a plant diversity gradient and among land-use types. **Ecology Letters** New York, v. 7, p. 684-694, 2004.

CERRI, C. E. P.; COLEMAN, K.; JENKINSON, D. S.; BERNOUX, M.; VICTORIA, R.; CERRI, C. C. Modelling soil carbon from forest and pasture ecosystems of Amazon, Brazil. **Soil Science Society of America Journal**, New York, v. 67, p. 1879-1887, 2003.

CERRI, C. E. P.; PAUSTIAN, K.; BERNOUX, M.; VICTORIA, R. L.; MELILLO, J. M.; CERRI, C. C. Modeling changes in soil organic matter in Amazon forest to pasture conversion with the Century model. **Global Change Biology**, New York, v. 10, p. 815 -832, 2004.

CERRI, C. C.; MELILLO, J. M.; FEIGL, B. J.; PICCOLO, M. C.; NEILL, C.; STEUDLER, P. A.; CARVALHO, M. C. S.; GODINHO, V. P.; CERRI, C. E. P.; BERNOUX, M. Recent history of the agriculture of the Brazilian Amazon Basin. Prospects for sustainable development and a first look at the biogeochemical consequences of pasture reformation. **Outlook on Agriculture**, New York, v. 34, n° 4, p. 215-223, 2005.

CHEN, M-M.; ZHU, Y-G.; SU, Y-H.; CHEN, B-D.; FU, B-J.; MARSCHNER, P. Effects of soil moisture and plant interactions on the soil microbial community structure. **European Journal of Soil Biology**, Berlin, v. 43, p. 31-38, 2007.

CICCARELLI, F. D.; DOERKS, T.; von MERING, C.; CREEVEY, C. J.; SNEL, B.; BORK, P. Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. **Science**, New York, v. 311, p. 1283-1287, 2006.

CLEGG, C. D. Impact of cattle grazing and inorganic fertilizer additions to managed grasslands on the microbial community composition of soils. **Applied Soil Ecology**, Berlin, v. 31, p. 73-82, 2006.

CLEVELAND, C. C.; TOWNSEND, A. R.; SCHMIDT, S. K.; CONSTANCE, B. C. Soil microbial dynamics and biogeochemistry in tropical forests and pastures, southwestern Costa Rica. **Ecological Applications**, New York, v. 13, n. 2, p. 314-326, 2003.

COURTOIS, S.; FROSTEGARD, A.; GORANSSON, P.; DEPRET, G.; JEANNIN, P.; SIMONET, P. Quantification of bacterial subgroups in soil: comparison of DNA extracted directly from soil or from cells previously released by density gradient centrifugation. **Environmental Microbiology**, New York, v. 3, n. 7, p. 431-439, 2001.

CRITTER, S.A.M., AIROLDI, C. The inhibitor effect of copper sulphate on microbial glucose degradation in red latosol soil. **Thermochimica Acta**, Berlin, v. 288, p. 73-82, 1996.

DAY, J. M.; NEVES, M. C. P.; DÖBEREINER, J. Nitrogenase activity on the roots of tropical forage grasses. **Soil Biology and Biochemistry**, Berlin, v. 7, p. 107-112, 1975.

DE BOER, W.; KOWALCHUK, G.A. Nitrification in acid soils: micro-organisms and mechanisms. Review. **Soil Biology and Biochemistry**, Berlin, v. 33, p. 853-866, 2001.

DEGENS, B.P. Decreases in microbial functional diversity do not result in corresponding changes in decomposition under different moisture conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, Berlin, v. 30, p. 1989-2000, 1998.

DEGENS, B.P.; SCHIPPER, L.A.; SPARLING, G.P.; VOJVODIC-VUKOVIC, M. Decreases in organic C reserves in soils can reduce the catabolic diversity of soil microbial communities. **Soil Biology and Biochemistry**, Berlin, v. 32, p. 189-196, 2000.

DEGRANGE, V.; BARDIN, R. Detection and counting of *Nitrobacter* populations in soil by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 61, p. 2093-2098, 1995.

DESJARDINS, T.; ANDREUX, F.; VOLKOFF, B.; CERRI, C. C. Organic matter and ¹³C contents in soils and soils size-fractions, and their changes due to deforestation and pasture installation in eastern Amazonia. **Geoderma**, Berlin, v. 61, p. 103-118, 1994.

DESJARDINS, T.; BARROS, E.; SARRAZIN, M.; GIRARDIN, C.; MARIOTTI, A. Effects of forest conversion to pasture on soil carbon content and dynamics in Brazilian Amazonia. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Berlin, v. 103, p. 365-373, 2004.

DIAZ-RAVINA, M.; ACEA, M. J.; CARBALLAS, T. Seasonal changes in microbial biomass and nutrient flush in forest soils. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 19, p. 220 - 226, 1995.

DILLY, O.; NANNIPIERI, P. Response of ATP content, respiration rate and enzyme activities in an arable and a forest soil to nutrient additions. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 34, p. 34-64, 2001.

DUGGIN, J. A.; VOIGHT, G. K.; BORMANN, F. H. Autotrophic and heterotrophic nitrification in response to clear-cutting northern hardwood forest. **Soil Biology and Biochemistry**, Berlin, v. 23, p. 779-787, 1991.

FEARNSIDE, P. M.; BARBOSA, R. I. Soil carbon changes from conversion of forest to pasture in Brazilian Amazonia. **Forest Ecology and Management**, Berlin, v. 108, p.147-166, 1998.

FEARNSIDE, P. M. Desmatamento na Amazônia brasileira: história, índices e conseqüências. **Megadiversidade**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 113-123, 2005.

FEIGL, B.J.; MELILLO, J.M.; CERRI, C.C. Changes in the origin and the quality of soil organic matter after pasture introduction in Rondônia (Brazil) **Plant and Soil**, Berlin, v.175, p.21-29, 1995 a.

FEIGL, B.J.; SPARLING, G.; ROSS, D.; CERRI, C.C. Soil microbial biomass in Amazonian soils: evaluation of methods and estimates of pools sizes. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 27, n. 2, p.1467-1472, 1995 b.

FEIGL, B.J.; STEUDLER, P.; CERRI, C.C. Effects of pasture introduction on soil CO₂ emissions during the dry season in the state of Rondônia, Brazil. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v.31, p.1-14, 1995 c.

FEIGL, B.; CERRI, C.; PICCOLO, M.; NORONHA, N.; AUGUSTI, K.; MELILLO, J.; ESCHENBRENNER, V.; MELO, L. Biological survey of a low-productivity pasture in Rondônia state, Brazil. **Outlook on Agriculture**, New York, v. 35, n. 3, p. 199-208, 2006.

FELSKE, A.; AKKERMANS, D. L. Spatial homogeneity of abundant bacterial 16S rRNA molecules in grassland soils. **Microbiology Ecology**, New York, v. 36, p. 31-36, 1998.

FELSENSTEIN, J. Confidence-limits on phylogenies - an approach using the bootstrap. **Evolution**, New York, v. 39, p. 783-791, 1985.

FERAY, C.; MONTUELLE, B. Competition between two nitrite-oxidizing bacterial populations: a model for studying the impact of wastewater treatment discharge on nitrification sediment. **FEMS Microbiology Ecology**, Berlin, v. 42, p. 15-23, 2002.

FERAY, C.; MONTUELLE, B. Chemical and microbial hypotheses explaining the effect of wastewater treatment plant discharges on the nitrifying communities in freshwater sediment. **Chemosphere**, Berlin, v.50, p. 919-928, 2003.

FERNANDES, S. A. P. **Propriedades do solo na conversão de floresta em pastagem fertilizada e não fertilizada com fósforo na Amazônia (Rondônia)**. Tese (Doutorado em Ciências), Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999. 131p.

FERNANDES, S. A. P.; BERNOUX, M.; CERRI, C. C.; FEIGL, B. J.; PICCOLO, M. C. Seasonal variation of soil chemical properties and CO₂ and CH₄ fluxes in unfertilized and P-fertilized pastures in an Ultisol of the Brazilian Amazon. **Geoderma**, Berlin, v. 107, p. 227 - 241, 2002.

FIERER, N.; JACKSON, R. B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, New York, v. 103, n. 3, p. 626 – 631, 2006.

FRANZLUEBBERS, A. J.; ZUBERER, D. A.; HONS, F. M. Comparison of microbiological methods for evaluating quality and fertility of soil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 19, p. 135 - 140, 1995.

GALTIER, N.; GOUY, M.; GAUTIER, C. Seaview and phylo win: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. **Bioinformatics**, Oxford, v. 12, n. 6, p. 543 - 548, 1996.

GARCÍA-MARTÍNEZ, J.; ACINAS, S.G.; ANTÓN, A.I.; RODRÍGUEZ-VALERA, F. Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. **Journal of Microbiological Methods**, Berlin, v. 36, p. 55 - 64, 1999.

GARCIA-MONTIEL, D.; NEILL, C.; MELILLO, J.; THOMAS, S.; STEUDLER, P.A.; CERRI, C.C. Soil phosphorus transformations following forest clearing for pasture in the Brazilian Amazon. **Soil Science Society of America Journal**, New York, v. 64, n. 5, p. 1792 - 1804, 2000.

GARCIA-MONTIEL, D.; STEUDLER, P.A.; PICCOLO, M. C.; MELILLO, J.; NEILL, C.; CERRI, C.C. Controls on soil nitrogen oxide emissions from forest and pastures in the Brazilian Amazon. **Global Biogeochemical Cycles**, New York, v. 15, n. 4, p. 1021 – 1030, 2001.

GELSOMINO, A.; KEIJZER-WOLTERS, A.C.; CACCO, G.; van ELSAS, J.D. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal of Microbiological Methods**, Berlin, v. 38, p. 1 - 15, 1999.

GERALDES, A. P. A.; CERRI, C. C.; FEIGL, B. J. Biomassa microbiana de solo sob pastagens na Amazônia. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 19, p. 55 - 60, 1995.

GRUNDMANN, G. L.; NORMAND, P. Microscale diversity of the genus *Nitrobacter* in soil on the basis of analysis of genes encoding rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 66, p. 4543 - 4546, 2000.

HEDRICK, D.B.; PEACOCK, A.; STEPHEN, J. R.; MACNAUGHTON, S.J.; BRUGGEMANN, J.; WHITE, D.C. Measuring soil microbial community diversity using polar lipid fatty acid and denaturing gradient gel electrophoresis data. **Journal of Microbiological Methods**, Berlin, v. 41, p. 235 - 248, 2000.

HETCH, S. B. Deforestation in the Amazon Basin: magnitude, dynamics and soil resource effects. **Study Third World Society**, New York, v. 13, p. 61 - 101, 1982.

HOVANEC, T. A.; TAYLOR, L. A.; BLAKIS, A.; DELONG, E. F. Nitrospira-like bacteria associated with nitrite oxidation in freshwater aquaria. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 64, p. 258 - 264, 1998.

HUANG, J.; MULLAPUDI, N.; LANCTO, C. A.; SCOTT, M.; ABRAHAMSEN, M. S.; KISSINGER, J. C. Phylogenomic evidence supports past endosymbiosis, intracellular and horizontal gene transfer in *Cryptosporidium parvum*. **Genome Biology**, New York, v. 5, n. 11, R88, 2004.

HUBER, T.; FAULKNER, G.; HUGENHOLTZ, P. BELLEROPHON: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. **Bioinformatics**, Oxford, v. 20, n. 14, p. 2317 - 2319, 2004.

INSAM, H. Developments in soil microbiology since the mid 1960s. **Geoderma**, Berlin, v. 100, p. 389 - 402, 2001.

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. INPE. 2006. Disponível em: www.inpe.br/noticias/noticia.php?Cod_Noticia=947. Acesso em: 10 jan. 2007.

JENKINSON, D. S.; POWLSON, D. S. The effects of biocidal treatment on metabolism in soil-V. A method for measuring soil biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, Berlin, v. 8, p. 209 - 213, 1976.

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

JIANG, Q. Q.; BAKKEN, L. R. Comparison of *Nitrosospira* strains isolated from terrestrial environments. **FEMS Microbiology Ecology**, Berlin, v. 30, p. 171 - 186, 1999.

JOERGENSEN, R. G.; BROOKES, P. C. Ninhydrin-nitrogen measurements of microbial biomass in 0,5 M K₂SO₄ soil extracts. **Soil Biology and Biochemistry**, Berlin, v. 22, p. 1023 - 1027, 1990.

KANDELER, E.; TSCHERKO, D.; BRUCE, K.D.; STEMMER, M.; HOBBS, P. J.; BARDGETT, R. D.; AMELUNG, W. Structure and function of the soil microbial community in microhabitats of a heavy metal polluted soil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 32, p. 390 - 400, 2000.

KELTING, D. L.; BURGER, J. A.; PATTERSON, S. C.; AUST, W. M.; MIWA, M.; TRETTIN, S. C. Soil quality indicators to assess sustainable forest management – a southern pine example. **Forest Ecology and Management**, Berlin, v. 122, p. 167 - 185, 1999.

KENNEDY, A. C.; SMITH, V. L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. **Plant and Soil**, Berlin, v. 170, n. 1, p. 75 - 86, 1995.

KENNEDY, A. C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 74, n. 1, p. 65 - 76, 1999.

KIM, J-S.; SPAROVEK, G.; LONGO, R. M.; MELO, W. J.; CROWLEY, D. Bacterial diversity of terra preta and pristine forest soil from the Western Amazon. Short communication. **Soil Biology and Biochemistry**, Berlin, v. 39, p. 684 - 690, 2007.

KOWALCHUK, G.A.; STEPHEN, J.R.; DE BOER, W.; PROSSER, J.I.; EMBLEY, T.M.; WOLDENDORP, J.W. Analysis of β -proteobacteria ammonia-oxidizing bacteria in coastal sand dunes using denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR amplified 16S rDNA fragments. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 63, p. 1489 - 1497, 1997.

KOZDRÓJ, J.; VAN ELSAS, J. D. Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. **Journal of Microbiological Methods**, Berlin, v. 43, p. 197 - 212, 2001.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, Oxford, v. 5, n. 2, p. 150 - 163, 2004.

LAVELLE, P. Ecological challenges for soil science. **Soil Science**, Washington, v.165, n. 1, p. 73 - 86, 2000.

LEITA, L.; DE NOBILI, M.; MUHLBACHOVA, G.; MONDINI, C.; MARCHIOL, L.; ZERBI, G. Bioavailability and effects of heavy metals on soil microbial biomass survival during laboratory incubation. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 19, p. 103 – 108, 1995.

LI, K. B. Clustal W-MPI: clustal W analysis using distributed and parallel computing. **Bioinformatics**, Oxford, v. 19, n. 12, p. 1585 – 1586, 2003.

LINHARES, A. A. Estimates of actinomycetes from Brazilian soils using the dispersion and differential centrifugation techniques. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MICROBIAL ECOLOGY, 7., 1995, São Paulo. **Abstract**. São Paulo, Winner Graphic, 1995.

LÓPES-FIUZA, J.; BUYS, B.; MOSQUERA-CORRAL, A.; OMIL, F.; MÉNDEZ, R. Toxic effects exerted on methanogenic, nitrifying, denitrifying bacteria by chemicals used in a milk analysis laboratory. **Enzyme and Microbial Technology**, London, v. 31, p. 976 – 985, 2002.

LUIZÃO, R. C. C.; BONDE, T. A. A.; ROSSWALL, T. Seasonal variation of soil microbial biomass: the effect of cleafelling a tropical rainforest and establishment of pasture in the central amazon. **Soil Biology and Biochemistry**, London, v. 24, p. 805 - 813, 1992.

LYNCH, J. M.; PANTING, L. M. Cultivation and the soil biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, London, v. 12, p. 29 - 33, 1980.

LYNCH, J. M.; PANTING, L. M. Effects of season, cultivation and nitrogen fertilizer on the size of the microbial biomass. **Journal of Science and Food Agriculture**, New York, v. 23, p. 249 - 252, 1982.

MALHAUTIER, L.; DEGRANGE, V.; GUAY, R.; DEGORCE-DUMAS, J. R.; BARDIN, R.; LE CLOIREC, P. Estimating size and diversity of nitrifying communities in deodorizing filters using PCR and immunofluorescence. **Journal of Applied Microbiology**, New York, v. 85, p. 255 - 262, 1998.

MANFIO, G. P.; GOODFELLOW, M. Diversity of *Streptomyces* in a tropical rain forest site: comparison of extraction methods. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MICROBIAL ECOLOGY, 7., 1995, São Paulo. **Abstract**. São Paulo, Winner Graphic, 1995.

MARCHIORI JÚNIOR, M.; MELO, W. J. 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**, Viçosa, v. 23, p. 257 - 263, 1999.

MATSON, P. A.; VITOUSEK, P. M.; LAVINGSTON, G. P.; SWANBERG, N. A.; Sources of variation in nitrous oxide flux ecosystems. **Journal of Geophysics Research**, New York, v. 95, p. 789 – 798, 1990.

MORAES; J.F.L.; CERRI, C.C., MELILLO, J.M.; KICKLIGHTER, D.; NEILL, C.; STEUDLER, P.; SKOLE, D. Soil carbon stocks of the Brazilian Amazon basin. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 59, p. 244 - 247, 1995.

MORAES, J.F.L.; VOLKOFF, B.; CERRI, C.C.; BERNOUX, M. Soil properties under Amazon forest and changes due to pasture installation in Rondônia, Brazil. **Geoderma**, Amsterdam, v. 70, p. 63 - 81, 1996.

MUYZER, G., WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 59, p. 695 – 700, 1993.

MUYZER, G.; RAMSING, N.B. Molecular methods to study the organization of microbial communities. **Water Science Technology**, London, v. 8, p. 1 - 9, 1995.

MYERS, R.J.K.; ROBBINS, G.B. Sustaining productive pastures in tropics. 5. Maintaining productive sown grass pastures. **Tropical Grasslands**, Sidney, v. 25, p. 104 - 110, 1991.

NEILL, C.; PICCOLO, M.C.; STEUDLER, P.A.; MELILLO, J.M.; FEIGL, B.J.; CERRI, C.C. Nitrogen dynamics in soils of forest and active pastures in the Western Brazilian Amazon Basin. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 27, n. 9, p. 1167 - 1175, 1995.

NEILL, C.; FRY, B.; MELILLO, J.M.; STEUDLER, P.A., MORAES, J.F.L.; CERRI, C.C. Forest-and pasture-derived carbon contributions to carbon stocks and microbial respiration of tropical pasture soils. **Oecologia**, Berlin, v. 107, p. 113 - 119, 1996.

NEILL, C.; PICCOLO, M. C.; CERRI, C. C.; STEUDLER, P. A.; MELILLO, J. M.; BRITO, M. M. P. Net nitrogen mineralization and net nitrification rates in soils following deforestation for pasture across the southwestern Brazilian Amazon basin landscape. **Oecologia**, Berlin, v. 110, p. 243 - 252, 1997 a.

NEILL, C.; MELILLO, J. M.; STEUDLER, P. A.; CERRI, C. C.; MORAES, J. F. L.; PICCOLO, M. C.; BRITO, M. M. P. Soil carbon and nitrogen stocks following forest clearing for pasture in the southwestern Brazilian Amazon. **Ecological Applications**, Washington, v. 7, n. 4, p. 1216 - 1225, 1997 b.

NEILL, C.; PICCOLO, M. C.; MELILLO, J. M.; STEUDLER, P. A.; CERRI, C.C. Nitrogen dynamics in Amazon forest and pasture soils measured by ¹⁵N pool dilution. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 31, p. 567 - 572, 1999.

NEILL, C.; PICCOLO, M. C.; CERRI, C. C.; STEUDLER, P. A.; MELILLO, J. M. Soil solution nitrogen losses during clearing of lowland Amazon forest for pasture. **Plant and Soil**, Berlin, v. 281, p. 233 - 245, 2006.

NOGUEIRA, M. A.; ALBINO, U. B.; BRANDÃO-JUNIOR, O.; BRAUN, G.; CRUZ, M. F.; DIAS, B. A.; DUARTE, R. T. D.; GIOPPO, N. M. R.; MENNA, P.; ORLANDI, J. M.; RAIMAM, M. P.; RAMPAZO, L. G. L.; SANTOS, M. A.; SILVA, M. E. Z.; VIEIRA, F. P.; TOREZAN, J. M. D.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, G. Promising indicators for assessment of agroecosystems alteration among natural, reforested and agricultural land use in southern Brazil. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 115, p. 237 - 247, 2006.

NUGROHO, R. A.; RÖLING, W. F. M.; LAVERMAN, A. M.; ZOOMER, H. R.; VERHOEF, H. A. Presence of *Nitrosospira* cluster 2 bacteria corresponds to N transformation rates in nine acid Scots pine forest soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Berlin, v. 53, p. 473 – 481, 2005.

NUGROHO, R. A.; RÖLING, W. F. M.; LAVERMAN, A. M.; VERHOEF, H. A. Low nitrification rates in acid scots pine forest soils are due to pH-related factors. **Microbial Ecology**, New York, v. 53, p. 89 - 97, 2007.

OHTONEN, R.; AIKIO, S.; VÄRE, H. Ecological theories in soil biology. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 1613 - 1619, 1997.

ORWIN, K. H.; WARDLE, D. A. New indices for quantifying the resistance and resilience of soil biota to exogenous disturbances. Short communication. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 1907 - 1912, 2004.

ORWIN, K. H.; WARDLE, D. A. Plant species composition effects on belowground properties and the resistance and resilience of the soil microflora to a drying disturbance. **Plant and Soil**, Berlin, v. 278, p. 205 - 221, 2005.

ORWIN, K. H.; WARDLE, D. A.; GREENFIELD, L. G. Context-dependent changes in the resistance and resilience of soil microbes to an experimental disturbance for three primary plant chronosequences. **Oikos**, London, v. 112, p. 196 - 208, 2006.

ØVREÅS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F. L.; TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake saelevannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 63, n. 9, p. 3367 - 3373, 1997.

PAUL, E. A.; CLARK, F. E. 1989. **Soil microbiology and biochemistry**. New York. Academic Press, 1989. 273 p.

PATRA, A. K. L.; ABBADIE, A.; CLAYS-JOSSERAND, V.; DEGRANGE, S. J.; GRAYSTON, P.; LOISEAU, F.; LOUAULT, S.; MAHMOOD, S.; NAZARET, L. PHILIPPOT, F.; POLY, J. I.; PROSSER, A.; RICHAUME, X.; LE ROUX, X. Effect of grazing on microbial functional groups involved in soil N dynamics. **Ecological Monographs**, Berlin, v. 75, p. 65 - 80, 2005.

PATRA, A. K.; LE ROUX, X.; ABBADIE, L.; CLAYS-JOSSERAND, A.; POLY, F.; LOISEAU, P.; LOUAULT, F. Effect of microbial activity and nitrogen mineralization on free-living nitrogen fixation in permanent grassland soils. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Berlin, v. 193, n. 2, p. 153 - 156, 2007.

PEDERSEN, H.; DUNKIN, K. A.; FIRESTONE, M. K. The relative importance of autotrophic and heterotrophic nitrification in a conifer forest soil as measured by ^{15}N tracer and pool dilution techniques. **Biogeochemistry**, Netherlands, v. 44, p. 135 - 150, 1999.

PICCOLO, M.C., NEILL, C.; CERRI, C.C. Net nitrogen mineralization and net nitrification along tropical forest-to-pasture chronosequence. **Plant and Soil**, Berlin, v. 162, n. 1, p. 61 - 70, 1994.

PICCOLO, M. C.; NEILL, C.; MELILLO, J.; CERRI, C. C.; STEUDLER, P. A. ^{15}N natural abundance in forest and pasture soils of the Brazilian Amazon Basin. **Plant and Soil**, Berlin, v. 182, p. 249 - 258, 1996.

PIRES, J. M.; PRANCE, G. T. The vegetation of the Brazilian Amazon. In: PRANCE, G. T.; LOVEJOY, T. M. (Ed.). Oxford: Pergamon Press, 1986. chap 1, p. 109 – 115.

POMMERENING-ROSER, A.; KOOPS, H-P. Environmental pH as an important factor for the distribution of urease positive ammonia-oxidizing bacteria. **Microbiological Research**, Oxford, v. 160, p. 27 - 35, 2005.

PROJETO RADAMBRASIL. Levantamento de recursos naturais. Rio de Janeiro: Departamento Nacional de Produção Mineral, 1978.

PURKHOLD, U.; POMMERENING-RÖSER, A.; JURETSCHKO, S.; SCHMID, M. C.; KOOPS, H-P.; WAGNER, M. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 66, p. 5368 - 5382, 2000.

REINERS, W. A.; BOUWMAN, A. F.; PARSONS, W. F. J.; KELLER, M. Tropical rain forest conversion to pasture – changes in vegetation and soil properties. **Ecological Applications**, Berlin, v. 4, n. 2, p. 363 - 377, 1994.

ROBBINS, G. M.; BUSHHELL, J. J.; MICKEON, G. M. Nitrogen immobilization in decomposing litter contributes to productivity decline in aging pastures of green panic (*Panicum maximum* var. trichoglume). **Journal of Agricultural Science**, Oxford, v. 113, p. 401 - 406, 1989.

ROBERTSON, G. P.; TIEDJE, J. M. Deforestation alters denitrification in a lowland tropical rain forest. **Nature**, New York, v. 336, p. 756 - 759, 1988.

RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. Flow injection analysis. New York: Wiley. **Interscience**, New York, 1981. 271p.

SANDAA, R. A.; ENGER, O.; TORSVIK, V. Abundance and diversity of *Archaea* in heavy-metal contaminated soils. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 65, n. 8, p. 3293 - 3297, 1999.

SANTRUCKOVA, H. Microbial biomass, activity and soil respiration in relation to secondary succession. **Pedobiologia**, Berlin, v. 36, p. 341 - 350, 1992.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology Evolutionary**, Oxford, v. 4, n. 4, p. 406 - 425, 1987.

SCHRAMM, A.; DE BEER, D.; WAGNER, M.; AMANN, R. Identification and activities in situ of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 64, p. 3480-3485, 1998.

SCHIMEL, J. P.; FIRESTONE, M. K.; KILLHAM, K. S. Identification of heterotrophic nitrification in a sierran forest soil. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 48, p. 802 - 806, 1984.

SCHLOTTER, M.; DILLY, O.; MUNCH, J. C. Indicators for evaluating soil quality. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 98, p. 255 - 262, 2003.

SCHROTH, G.; D'ANGELO, S. A.; TEIXEIRA, W. G.; HAAG, D.; LIEBEREI, R. Conversion of secondary forest into agroforestry and monoculture plantations in Amazônia: consequences for biomass, litter and soil carbon stocks after 7 years. **Forest Ecology and Management**, Berlin, v. 163, p. 131 - 150, 2002.

SCHWIEGER, F.; TEBBE, C. C. A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 35, p. 4870 - 4876, 1998.

SEGHERS, D.; VERTHE, K.; REHEUL, D.; BULCKE, R.; SICILIANO, S.D.; VERSTRAETE, W.; TOP, E.M. Effect of long-term herbicide applications on the bacterial community structure and function in an agricultural soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Berlin, v. 46, p. 139 - 146, 2003.

SERRÃO, E. A. S.; FALESI, I. C.; DA VEJA, J. B.; TEIXEIRA NETO, J. F. Productivity of cultivated pastures on low fertility soils of the Amazon region of Brazil. In: SANCHEZ, P. A.; TERGAT, T. E. (Ed.), **Pasture production on acid soils of the tropics**. Cali: CIAT, 1979. Chapter 5, p. 195 - 225.

SERRÃO, E. A. S.; HOMMA, A. K. O. **Recuperação e melhoramento de pastagens cultivadas em áreas de floresta Amazônica**. Belém: EMBRAPA/CPATU, 1982, 22p (Documentos, 17).

SERRÃO, E.A.S.; FALESI, I.C.; VEIGA, J.B.; TEIXEIRA NETO, J.F. Produtividade de pastagens cultivadas em solos de baixa fertilidade das áreas de floresta amazônica brasileira. In: TERGAS, L. E; SANCHEZ, P.A.; SERRÃO, E.A.S. **Produção de pastagens em solos ácidos dos trópicos**. Brasília: CIAT/EMBRAPA, 1982. p. 219 - 251.

SOUZA FILHO, A. P. S.; TEIXEIRA NETO, J. F.; VEIGA, J. B. **Adubação de pastagens de capim colômbio em degradação, em Santana do Araguaia (Pará)**. Belém: Embrapa/CPATU, 1991. 16p. (Boletim de Pesquisa, 120).

STEUDLER, P.A.; MELILLO, J.M.; FEIGL, B.J.; NEILL, C.; PICCOLO, M.C.; CERRI C.C. Consequences of forest-to-pasture conversion on CH₄ fluxes in the Brazilian Amazon Basin. **Journal of Geophysical Research. Series D**, Washington, v. 101, n. 13, p. 18547 - 18554, 1996.

STEVENSON, B. A.; SPARLING, G. P.; SCHIPPER, L. A.; DEGENS, B. P.; DUNCAN, L. C. Pasture and forest soil microbial communities show distinct patterns in their catabolic respiration responses at a landscape scale. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 49 - 55, 2004.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, p. 4673 - 4680, 1994.

TOLEDO, J. M.; NAVAS, J. Land clearing for pastures in the Amazon. In: LAL, R.; SANCHEZ, P.A.; CUMMINGS, R. W. (Ed.) **Land clearing and development in the Tropics**. Netherlands: Balkema, 1986. Chapter 10, p. 97 - 116.

TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 56, p. 782 - 787, 1990.

VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 19, p. 703 - 707, 1987.

VAN RAIJ, B.; ANDRADE, J. C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A. Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. **Instituto Agrônomo**, Campinas, 2001. 285p.

VEIGA, J. B. Reabilitação de áreas de pastagens degradadas. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E REABILITAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS E FLORESTAS SECUNDÁRIAS NA AMAZÔNIA. Santarém, 1995. **Anais**. Santarém, 1995.

VENTEREA, R. T.; GROFFMAN, P. M.; VERCHOT, L. V.; MAGILL, A. H.; ABER, J. D. Gross nitrogen process rates in temperate forest soils exhibiting symptoms of nitrogen saturation. **Forest Ecology and Management**, Berlin, v. 196, n. 1, p. 129 - 142, 2004.

WARDLE, D. A. A comparative assessment of factors which influence microbial biomass carbon and nitrogen levels in soil. **Biological Reviews**, London, v. 67, p. 321 - 355, 1992.

WATANABE, K.; KODAMA, Y.; HARAYAMA, S. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. **Journal of Microbiological Methods, Oxford**, v. 44, p. 253 - 262, 2001.

WEBSTER, G.; EMBLEY, T. M.; PROSSER, J. I. Grassland management regimens reduce small-scale heterogeneity and species diversity of beta-proteobacterial ammonia oxidizer populations. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 60, p. 20 - 30, 2002.

WEISBURG, W. G.; BARNES, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, New York, v. 173, n. 2, p. 697 - 703, 1991.

WHEATLEY, R. E.; CAUL, S.; CRABB, D.; DANIEL, T. J.; GRIFFITHS, B. S.; RITZ, K. Microbial population dynamics related to temporal variations in nitrification in three arable fields. **European Journal of Soil Science**, Amsterdam, v. 54, p. 707 - 714, 2003.

WILLIAMS, B. L.; SPARLING, G. P. Extractable N and P in relation to microbial biomass in UK acid organic soils. **Plant and Soil**, Berlin, v. 76, p. 139 - 148, 1984.

ZARIN, D. J.; DUCEY, M. J.; TUCKER, J. M.; SALAS, W. A. Potential biomass accumulation in Amazonian regrowth forests. **Ecosystems**, Berlin, v. 4, p. 658 - 668, 2001.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)