

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Diversidade microbiana em solos sob florestas de *Araucaria angustifolia*

Carolina Riviera Duarte Maluche Baretta

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Solos e Nutrição de Plantas

Piracicaba

2007

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Carolina Riviera Duarte Maluche Baretta

Engenheiro Agrônomo

Diversidade microbiana em solos sob florestas de *Araucaria angustifolia*

Orientador:

Prof. Dr. **MÁRCIO RODRIGUES LAMBAIS**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Solos e Nutrição de
Plantas

Piracicaba

2007

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

Maluche-Baretta, Carolina Riviera Duarte
Diversidade microbiana em solos sob florestas de *Araucaria angustifolia* /
Carolina Riviera Duarte Maluche-Baretta. - - Piracicaba, 2007.
184 p. : il.

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

1. Análise multivariada 2. Biologia 3. Microbiologia do solo 4. Pinheiro 5.
Química do solo 6. Seqüências do solo 7. Solo florestal I. Título

CDD 634.975

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

OFEREÇO

À **Deus** nosso **Pai** e criador.

Família e amigos

Aos meus avós queridos **Ulisses** e **Ires**, pelo amor incondicional e apoio em todos os momentos.

À minha mãe **Cristina**, pelo amor e carinho, exemplo de luta e garra.

Ao meu marido **Dilmar**, pelo companheirismo nas horas mais difíceis.

A minha tia **Luciana**, que mesmo longe sempre esteve muito presente.

AMO MUITO TODOS VOCES!!!!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por guiar meus caminhos, pela minha vida e oportunidade de crescimento diante dos obstáculos e, principalmente, por ter me dado neste plano terrestre a minha estrutura familiar.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Márcio Rodrigues Lambais, pelo estímulo e apoio em todas as fases deste trabalho, orientação, confiança, amizade e agradável convivência.

À Prof. Dra. Elke J.B.N. Cardoso pela oportunidade de integrar a equipe do projeto temático BIOTA/FAPESP intitulado “Biodiversidade vegetal e de organismos edáficos em ecossistemas de *Araucaria angustifolia* naturais e impactados no Estado de São Paulo”

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo e a Fapesp, pelo suporte financeiro na condução deste trabalho.

Aos meus familiares, em especial agradeço aos meus avós maternos, Ulisses e Ires Duarte, e minha mãe Cristina, pela educação moral, apoio e amor incondicional. Se não fosse por vocês talvez esta jornada não tivesse chegado ao fim. Devo tudo a vocês!

Aos meus tios Luciana e Gilmar, meus irmãos de coração, pelo carinho e apoio nesta e em muitas caminhadas. Obrigado pela presença em minha vida, sei que posso contar sempre com vocês !!!

Ao meu marido, pelo amor, carinho, companheirismo e paciência dedicados. Agradeço também aos seus familiares, por torcerem sempre por nós.

Aos professores doutores, José Paulo de Sousa e Paula Morais, e a Dra. Fernanda da Universidade de Coimbra, Portugal, pelo apoio e orientação durante o período de estágio no exterior.

Aos técnicos dos laboratórios de Microbiologia e Microbiologia Molecular da ESALQ, Wladimir, Denise e Fernando, pessoas muito especiais, pela ajuda e amizade, e a funcionária Odete do laboratório de Microbiologia e Bioquímica da Universidade de Coimbra, Portugal.

Aos colegas do projeto temático Biota/FAPESP, em especial Camila, Daniel, Ézio e Rafaela, pela amizade, apoio e importantes discussões sobre o trabalho.

Aos colegas e amigos de laboratório, pelos momentos de trabalho, companheirismo e diversão: Adriano Lucheta, Gisele Lopes, Giselle, Lucas Azevedo, Márcio Morais, Rafael Armas, Robinson Moresca, Soraya Kiriachek, Winston e todos estagiários.

Aos colegas que já se foram: Ana, Daniele Takahashi, Denise Santos, Juliano Cury, Karina Cenciani, Pablo Hardoim e Simão Lindoso.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 DESENVOLVIMENTO	13
2.1 Revisão bibliográfica	13
2.1.1 <i>Araucaria angustifolia</i> (Bertoloni) O. Ktze	13
2.1.2 Impacto da ação antrópica em Florestas de Araucária	15
2.1.3 Fogo em Florestas de Araucária	16
2.1.4 Efeito do reflorestamento e do fogo sobre atributos microbiológicos do solo.....	17
2.1.5 Diversidade microbiana do solo	19
2.1.6 Métodos de avaliação de comunidades microbianas dos solo	23
2.1.6.1 Biomassa microbiana do solo, atividade respiratória e quociente metabólico	24
2.1.6.2 Capacidade de utilização de substratos de carbono (Biolog)	24
2.1.6.3 Perfis de ácidos graxos ligados a ésteres de fosfolípidios (PLFAs)	25
2.1.6.4 Medida da diversidade microbiana através de técnicas moleculares	26
2.2 Objetivos	30
2.2.1 Objetivo geral	30
2.2.2 Objetivos específicos	30
2.2 Material e métodos	31
2.2.1 Descrição da área de estudo	31
2.2.2 Esquema experimental	37
2.2.3 Amostragem	38
2.2.4 Processamento das amostras	38
2.2.5 Avaliação dos atributos químicos	39
2.2.6 Avaliação dos atributos microbiológicos	39
2.2.7 Análises da estrutura das comunidades de <i>Bacteria</i> e <i>Archaea</i> por DGGE.....	40
2.2.7.1 Extração do DNA total do solo	40
2.2.7.2 PCR	41
2.2.7.3 DGGE	42

2.2.8 Análise de comunidades de <i>Bacteria</i> através do seqüenciamento de clones do gene rRNA 16S	43
2.2.8.1 Seleção das amostras	43
2.2.8.2 Amplificação de fragmentos do gene rRNA 16S	43
2.2.8.3 Purificação dos <i>amplicons</i>	43
2.2.8.4 Clonagem dos <i>amplicons</i> do gene rRNA 16S	44
2.2.8.5 Extração do DNA plasmidial	45
2.2.8.6 Seqüenciamento dos clones do gene rRNA 16S	46
2.2.9 Capacidade de utilização de substratos de carbono (Biolog)	46
2.2.10 Perfis de ácidos graxos ligados a ésteres de fosfolipídios (PLFAs)	47
2.2.11 Análise dos dados	49
2.2.11.1 Análise estatística de dados químicos e microbiológicos	49
2.2.11.2 Análise da diversidade genética	49
2.2.11.3 Análises das seqüências do gene rRNA 16S	50
2.2.11.4 Análise estatística da capacidade de utilização de substratos de carbono (Biolog)	51
2.2.11.5 Análise estatística dos perfis de ácidos graxos ligados a ésteres de fosfolipídios (PLFAs)	54
2.3 Resultados e Discussão	56
2.3.1 Atributos químicos do solo	56
2.3.2 Atributos microbiológicos do solo	60
2.3.3 Análise canônica discriminante (ACD) de atributos químicos e microbiológicos do solo	66
2.3.4 Estrutura das comunidades de <i>Bacteria</i> e <i>Archaea</i>	71
2.3.5 Seqüenciamento de clones do gene rRNA 16S de <i>Bacteria</i>	81
2.3.5.1 Afiliação filogenética de seqüências dos clones do gene rRNA 16S	81
2.3.5.2 Estimativas de riqueza e índices de diversidade do solo	102
2.3.6 Capacidade de utilização de substratos de carbono (Biolog)	114
2.3.6.1 Cinética dos diferentes grupos de substratos de carbono	121
2.3.7 Perfis de ácidos graxos ligados a ésteres de fosfolipídios (PLFAs)	127
2.3.8 Relação entre diversidade bacteriana e funções da microbiota em solos de Florestas de Araucária	136

3 CONCLUSÕES 141
REFERÊNCIAS 143
ANEXO 174

RESUMO

Diversidade microbiana em solos sob florestas de *Araucaria angustifolia*

A Floresta Ombrófila Mista também chamada de Floresta de Araucária representa um dos mais ricos remanescentes de florestas pluviais subtropicais brasileiras, tendo como principal representante a *Araucaria angustifolia*, espécie considerada ameaçada de extinção. A diversidade microbiana possui um importante papel no funcionamento e manutenção do equilíbrio dos ecossistemas florestais, mas é desconhecida em solos com araucária. O presente estudo teve como objetivo avaliar a diversidade, funcionalidade e estrutura das comunidades microbianas em florestas de *Araucaria angustifolia* natural, introduzida e impactada pela queima acidental. O estudo foi realizado no Parque Estadual de Campos de Jordão, SP, tendo como áreas de estudo: floresta nativa com domínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF), e reflorestamento de araucária com queima acidental em julho de 2001 (RQ). Em cada área, foram escolhidas ao acaso dez árvores de araucária e ao redor de cada árvore coletou-se uma amostra composta de três subamostras. Foram avaliados atributos químicos, microbiológicos, estrutura das comunidades de *Bacteria* e *Archaea* por PCR-DGGE e seqüenciamento parcial do gene rRNA 16S de *Bacteria*, análise da capacidade de utilização de substratos de carbono (Biolog) e perfis de ácidos graxos ligados a ésteres de fosfolipídios (PLFAs). As áreas são caracterizadas por solos ácidos, com elevado conteúdo de matéria orgânica (MO) e baixa disponibilidade de cátions metálicos básicos. A área FN apresentou maiores teores de carbono da biomassa microbiana (CBM), atividade respiratória basal (C-CO₂) e relação carbono da biomassa microbiana: carbono orgânico total (CBM:COT), comparada ao RF e RQ. Os maiores valores de quociente metabólico (qCO_2) foram encontrados no RQ quando comparado a FN e RF. A análise canônica discriminante identificou o atributo microbiano qCO_2 e químicos, Mg e pH, como sendo responsáveis pela discriminação das áreas, seguidos do teor de P. A análise de PCR-DGGE revelou que as estruturas das comunidades bacterianas de FN e RQ foram mais similares entre si do que em RF. A análise de escala multidimensional (NMDS) com ANOSIM baseada nos perfis de *amplicons* de *Bacteria* mostrou que as três áreas são diferentes entre si, enquanto para *Archaea* não houve diferença entre as áreas estudadas. A afiliação taxonômica das seqüências de clones do gene rRNA 16S mostrou que o solo de FN apresenta uma maior diversidade de táxons. Os filos *Proteobacteria* e *Actinobacteria* foram os mais freqüentes nas três áreas. A maior diversidade estimada pelo índice de Shannon foi encontrada em RQ, em comparação a FN e RF. A análise por Biolog mostrou que área FN apresenta a maior taxa de utilização de substratos, em relação RF e RQ, as quais não diferiram entre si. Os perfis de PLFAs não apresentaram diferenças entre as áreas estudadas. Observou-se uma maior biomassa bacteriana, principalmente de Gram-positivas, quando comparada a biomassa fúngica de PLFAs das áreas estudadas. As análises multivariadas apresentaram-se como importantes ferramentas no estudo de diversidade microbiana, sendo os atributos químicos e microbiológicos do solo úteis para a interpretação dos resultados obtidos.

Palavras-chave: Floresta Ombrófila Mista; Atributos químicos do solo; Atributos microbiológicos do solo; Solo; *Bacteria*; *Archaea*; PCR-DGGE; Seqüenciamento; Biolog; PLFAs; Análises multivariadas

ABSTRACT

Microbial diversity in soils under *Araucaria angustifolia* forests

The Ombrophilic Mixed Forest, also called Araucaria Forest, represents one of the richest remainders of subtropical pluvial forests in Brazil. Its main representative species is the endangered *Araucaria angustifolia*. The microbial diversity plays an important role in functioning of forest ecosystems. However, the microbial diversity in soils with araucaria forests is mostly unknown. The aim of this work was to evaluate the diversity, structure of microbial communities in their possible functions in a natural preserved araucaria forest (FN), a planted araucaria forest (RF) and a planted araucaria forest impacted by accidental fire (RQ). The study was carried out at the State Park of Campos of Jordão (SP). For each area, ten araucaria trees were randomly selected and a sample composed of three sub-samples was collected at approximately one meter from the trunk of each tree. Chemical and microbiological attributes, as well as structures of bacterial and archaeal communities were evaluated using PCR-DGGE and the partial sequencing of the 16S rRNA gene from *Bacteria*, community level physiological profiles using Biolog, the phospholipid fatty acids profiles (PLFAs). The studied areas were characterized by acidic soils, with high content of organic matter (OM) and low availability of basic metallic cations. The area FN presented the highest contents of carbon in the microbial biomass (CBM), higher basal respiration activity (C-CO₂) and higher microbial biomass carbon: total organic carbon ratio (CBM:TOC), compared to RF and RQ. The highest values of metabolic quotient (*q*CO₂) were observed in RQ, when compared to FN and RF. Using canonical discriminant analysis (CDA), *q*CO₂, Mg concentration and pH were identified as the main attributes responsible for the discrimination of the areas, followed by the P concentration. The PCR-DGGE analysis revealed that the bacterial community structures in FN and RQ share higher levels of similarity, as compared to RF. Non-metric multidimensional scale analysis (NMDS) and ANOSIM based on the profiles of bacterial 16S rRNA gene amplicons showed that the all three areas had different bacterial communities, whereas archaeal communities were similar, based on 16S rRNA genes amplicon profiles. The phylogenetic affiliation of 16S rRNA gene clone sequences showed that soil from FN presents higher taxa diversity, as compared to RF and RQ. The phyla *Proteobacteria* and *Actinobacteria* were the most frequent in the three areas studied. Higher Shannon index was observed in RQ soil than FN and RF soils. Biolog analysis showed that FN has the highest substrate utilization rates, when compared to RF and RQ, which did not show significant differences. In general, PLFAs profiles did not show differences for the areas studied. Estimated bacterial biomass was higher than fungal biomass, with predominance of Gram-positive bacteria. Integration of chemical and microbial attributes through multivariate analyses is essential for identifying the factors determining microbial community structure in forest soils.

Keywords: Ombrophilic Mixed Forest; Chemical attributes of the soil; Microbiological attributes of the soil; Soil; *Bacteria*; *Archaea*; PCR-DGGE; Sequencing; Biolog; PLFAs; Multivariate analysis

1 INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta a maior cobertura de florestas tropicais do mundo, abrigando uma imensa diversidade biológica ainda desconhecida, e em avançado estágio de devastação. A conservação da Mata Atlântica é um grande desafio para o desenvolvimento ambiental, principalmente, devido ao conhecimento existente sobre sua diversidade, ainda permanecer bastante fragmentado. Dentre as formações florestais críticas que compõem o bioma Mata Atlântica, encontra-se a Floresta Ombrófila Mista mais conhecida como Floresta de Araucária (LOBO, 2003).

A Floresta de Araucária, assim chamada pela abundância e frequência de sua principal espécie, a *Araucaria angustifolia*, cobre uma superfície que se estende desde o Estado do Espírito Santo até o Rio Grande do Sul. A fragmentação e a dispersão da espécie, principalmente pela abundante exploração madeireira em meados da década de 30 (REITZ; KLEIN; REIS, 1988), bem como sua baixa utilização em programas de reflorestamento nas regiões Sul e Sudeste (BLUM, 1977), contribuíram para a redução da variabilidade genética da araucária, colocando-a sob efetivo risco de desaparecimento, o que a classifica como espécie da Flora Brasileira ameaçada de extinção (BRASIL, 1992).

O conhecimento da biodiversidade de organismos associados às florestas de araucária é necessário para o estímulo à geração e difusão de conhecimento científico e tecnológico, permitindo a conservação dos remanescentes da Floresta de Araucária estimulando seu manejo sustentável. A importância dos estudos relacionados às Florestas de Araucária não reside somente à redução deste ecossistema a pequenos fragmentos, mas também porque nestes encontram-se recursos genéticos significantes e desconhecidos para o homem (SOLÓRZANO-FILHO; KRAUS, 1999).

Dentre os recursos genéticos significantes ao homem, como a própria diversidade vegetal e animal, destaca-se, a possível riqueza e diversidade de microrganismos, com papéis funcionais na manutenção e equilíbrio do ecossistema, cuja diversidade em Florestas de Araucária é desconhecida. O estudo da diversidade microbiana do solo tem sido considerado importante na sustentabilidade de ecossistemas florestais, cuja redução ou eventual extinção de espécies possa comprometer funções do solo, sua resiliência e produtividade (GILLER et al., 1997). A caracterização da diversidade microbiana em ambientes naturais e impactados pode fornecer

informações sobre como as comunidades microbianas funcionam, além da composição destas comunidades frente às mudanças ambientais (ØVREÅS, 2000).

Um problema central nos estudos de ecologia de microrganismos edáficos é associar a diversidade microbiana encontrada com a sua função no solo, bem como a compreensão das relações entre diversidade genética e a estrutura de comunidades (NANNIPIERI et al., 2003). O entendimento dessas relações vem sendo dificultado pela incapacidade de se cultivar a maioria dos microrganismos do solo. O solo, como um universo ainda a ser descoberto, abriga em um grama mais de 10 bilhões de microrganismos de diferentes espécies (ROSELLÓ-MORA; AMANN, 2001), sendo que menos de 1% deste total são passíveis de serem cultivados em meios tradicionais (TORSVIK; ØVREÅS, 2002).

A perspectiva de uma vasta diversidade de microrganismos não-cultiváveis no solo estimulou o desenvolvimento de técnicas que permitem o estudo dessas comunidades microbianas independente de seu cultivo. Técnicas moleculares revolucionaram o estudo da ecologia microbiana dos solos, aliadas aos avanços da bioinformática e dos métodos de análise estatística, permitindo a caracterização de uma diversidade microbiana até então desconhecida, e da organização de suas comunidades (LAMBAIS et al., 2005).

O presente estudo teve como objetivo geral avaliar a diversidade, funcionalidade e estrutura das comunidades microbianas, principalmente de *Bacteria*, em florestas de *Araucaria angustifolia* natural, introduzida e impactada pela queima acidental. Tal objetivo fundamenta-se nas seguintes hipóteses: 1) as áreas de *Araucaria angustifolia* estudadas apresentam estruturas de suas comunidades microbianas diferentes, com menor riqueza das espécies nos ambientes mais impactados (reflorestamento e reflorestamento com queima) em relação à floresta nativa; 2) alguns atributos químicos e microbiológicos do solo correlacionam-se com a diversidade de microrganismos encontrados nestas áreas.

Este trabalho está associado ao projeto temático BIOTA/FAPESP (2004) intitulado “Biodiversidade vegetal e de organismos edáficos em ecossistemas de *Araucaria angustifolia* naturais e impactados no Estado de São Paulo”

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) O. Ktze.

A Floresta Ombrófila Mista também chamada de Floresta de Araucária representa um dos mais ricos remanescentes de florestas pluviais subtropicais brasileiras, ocupando atualmente cerca de 10% do seu território de ocorrência original (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 1992), sendo até mesmo considerado este valor em cerca de 3% (REITZ; KLEIN; REIS, 1988). A Floresta de Araucária pode ser encontrada desde o Sul do Brasil, ocorrendo nos estados do Paraná, onde abrange cerca de 40% do total de suas formações, de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (respectivamente, 31 e 25% do total de sua ocorrência), com manchas esparsas no Sul de São Paulo (3%), indo até o Sul de Minas Gerais e Rio de Janeiro, não ultrapassando nestes dois estados 1% de sua área total de ocorrência (CARVALHO, 1994).

Estruturalmente formada pela presença de uma notável gama de espécies de plantas e animais, com destaque a uma vegetação arbórea, a Floresta Ombrófila Mista, tem na *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) O. Ktze. sua principal representante. A *Araucaria angustifolia*, vulgarmente chamada de Pinheiro-do-Paraná por sua vasta ocorrência e distribuição nas regiões central, sul e oeste do Estado do Paraná, é uma planta arbórea de grande porte, densamente disposta, de tronco reto, uniforme e cilíndrico, pertencente à família *Araucariaceae* (SOLÓRZANO-FILHO; KRAUS, 1999). A espécie é dióica, com desenvolvimento de suas sementes a partir de óvulos nus sem a presença de ovários, pertencente à divisão *Gymnosperma* (SOLÓRZANO-FILHO; KRAUS, 1999). Seu óvulo quando fecundado é protegido por uma folha estéril que o envolve e o encerra, formando um cone maduro composto por unidades isoladas, o chamado pinhão (JOLY, 1977).

A Floresta de Araucária não se constitui de uma formação homogênea e contínua, e forma juntamente com outras espécies como a erva-mate (*Ilex paraguariensis*), pinheiro-bravo (*Podocarpus lambertii*), imbuia (*Ocotea porosa*) e diversas representantes das famílias botânicas

Lauraceae e *Myrtaceae*, a formação vegetal da mata de pinheiros brasileiros (SOLÓRZANO-FILHO; KRAUS, 1999).

Com o desenvolvimento intimamente relacionado às condições de altitude (SANQUETTA; TETTO, 1999), a ocorrência da *Araucaria angustifolia* se dá entre altitudes médias variando de 600 a 800 m, podendo ser encontrada em altitudes superiores a 1.500 m. A espécie encontra-se entre os paralelos 21 e 30° de latitude Sul e entre os meridianos 44 e 54° de longitude Oeste (SUADICANI, 1993). Como condições climáticas, as Florestas de Araucária ocorrem sob clima temperado úmido tendo algumas formações sob elevações da zona subtropical, com temperaturas médias anuais entre 13 e 18°C, e mínimas inferiores a 0°C em algumas regiões (SCHEEREM et al., 2000).

A *Araucaria angustifolia* é uma espécie exigente em condições climáticas e qualidade do solo, limitando as regiões preferenciais para implantação de novos reflorestamentos; mesmo ocorrendo sobre os mais variados tipos de solos, desde os solos pobres derivados do arenito dos campos gerais do Paraná, até os solos férteis e escuros derivados do basalto encontrados nos estados do Paraná (Sudoeste) e Santa Catarina (Oeste) (ROMARIZ, 1973). A araucária apresenta limitações quanto à presença de alumínio, impedindo o seu crescimento e desenvolvimento em reflorestamentos, e quanto à profundidade e estrutura dos solos, os quais necessitam serem profundos, bem estruturados, e com boa capacidade de retenção de água (GOLFARI, 1967).

Estudos com espécies de *Pinus* sp. e *Araucaria angustifolia*, mostram uma maior exigência nutricional em termos de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e boro, para a araucária quando comparado ao *Pinus* sp. (BLUM, 1977). Níveis de cálcio e magnésio inferiores a 2 cmol_c dm⁻³ e alumínio superior a 50% da saturação, interferem no crescimento e desenvolvimento da espécie (Van GOOR, 1965). A ausência de nutrientes essenciais, principalmente o P, limita o desenvolvimento da araucária em condições de reflorestamento, bem como interfere sobre o potencial de regeneração natural da espécie (CASSOL, 1982; SIMÕES, 1973).

Mesmo em condições de mata nativa a regeneração natural da espécie através da dispersão de suas sementes é prejudicada. A *Araucaria angustifolia*, é uma espécie que tem algumas características de pioneira, pois apresenta regeneração natural na floresta onde ocorre, podendo com freqüência ocupar áreas de campo (GURGEL FILHO, 1980; HUECK, 1953; RIZZINI, 1976; SILVA et al, 2001). No entanto, segundo Soares (1979), ela não possui

características fundamentais das espécies pioneiras. Características como o próprio peso das sementes, baixa longevidade natural, recalcitrância à germinação, predação por roedores, primatas e aves, dificultam a preservação da espécie (LORENZI, 1992), e a desqualificam como espécie pioneira.

2.1.2 Impacto da ação antrópica em Florestas de Araucária

Considerada uma das mais belas formações florestais brasileiras, a Floresta de Araucária sofreu ao longo dos anos um extenso processo de desmatamento. A colonização dos estados do Sul do Brasil, principalmente do Paraná, em meados das décadas de 30, impulsionou a economia regional através do extrativismo madeireiro e, posteriormente, utilização destas áreas para fins de produção agropecuária, dizimando aproximadamente 176.641 Km² da extensão original de Florestas de Araucária (REITZ; KLEIN; REIS, 1988).

A grande qualidade de sua madeira fez com que *Araucaria angustifolia*, na década de 60, fosse responsável por 90% do total de madeira exportada no Brasil, sendo nesta época considerada o 4º produto de exportação brasileira (SOLÓRZANO-FILHO; KRAUS, 1999). Neste mesmo período, regiões de menor ocorrência da floresta tiveram sua área quase que totalmente dizimada. Foi que o que ocorreu nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro.

No Estado de São Paulo, a Floresta Ombrófila Mista tem sua zona de ocorrência nas regiões de maior altitude, abrangendo municípios do Sul e Sudeste nas serras do Paranapiacaba, Mantiqueira e Cantareira; sendo atração turística e símbolo do município de Campos de Jordão e região, no Vale do Paraíba (LOBO, 2003). Neste Estado, a exploração madeireira levou ao desaparecimento de cerca de 50.000 hectares de pinheirais e a espécie *Araucaria angustifolia* foi condenada ao desaparecimento pela redução do número de exemplares existentes (LOBO, 2003).

Atualmente, remanescentes de Florestas de Araucária encontram-se muito fragmentados e dispersos, o que contribui para diminuir ainda mais a variabilidade genética da espécie, colocando-a sob efetivo risco de extinção. Nesse sentido, a carência de dados técnicos relacionados à sua ecologia contribuiu para o aumento da vulnerabilidade da espécie (MILANEZ; MONTEIRO NETO, 1950). Desta forma através da Portaria nº. 37-N, de 3 de abril de 1992, o IBAMA torna pública a Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçada de Extinção e

classifica a *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) O. Ktze na categoria de espécie ameaçada de extinção.

Grande parte da recuperação das áreas com araucária se deu através de programas de reflorestamento, no entanto, com pouca representatividade quanto à preservação econômica da espécie. Apesar da excelente qualidade da madeira para diversos usos, sua importância sócio-econômica e ecológica, e a grande potencialidade para a implantação de maciços florestais, a *Araucaria angustifolia* tem sido relegada em segundo plano nos projetos de reflorestamento. A pequena área reflorestada é creditada, em parte, à exigência de solos de boa qualidade pela espécie, à falta de conhecimento sobre técnicas adequadas ao plantio em diferentes condições edafoclimáticas, e a dificuldade de obtenção de sementes de boa qualidade e procedência, melhoradas geneticamente. Desta forma, à falta de conhecimentos de técnicas silviculturais e nutricionais, que proporcionem melhor relação produtividade/custo de produção, e principalmente, o menor crescimento volumétrico da espécie, direcionaram os reflorestamentos com espécies tradicionalmente plantadas dos gêneros *Pinus* e *Eucalyptus* (HOPPE; CALDEIRA, 2003).

Desta maneira, em meados da década de 60, extensivos reflorestamentos de áreas desmatadas foram feitos com gêneros exóticos, como *Pinus* e *Eucalipto*, entre outros, devido ao rápido crescimento e a possibilidade de lucro em curto prazo, quando comparados à espécie nativa (NUTTO, 2001). Nessa fase, a falta de conhecimento ecológico e desinteresse econômico pela araucária, promoveram inúmeros erros em áreas reflorestadas com a espécie, causando danos irreparáveis, o que aumentou o desinteresse comercial por essa espécie (ALBUQUERQUE, 2003).

2.1.3 Fogo em Florestas de Araucária

A ação antrópica sobre as Florestas de Araucária não se limitou apenas ao desmatamento, mas também a exploração de suas sementes, áreas para pastejo de animais e aumento da ocorrência de incêndios florestais. Os incêndios florestais, cuja incidência natural constitui-se de um distúrbio fundamental de vários ecossistemas na superfície terrestre, teve a sua frequência e intensidade agravada pela ação do homem (GLIESSMAN, 2001).

A alta combustão, dada principalmente pelas suas acículas, tornam as florestas naturais da espécie e seus reflorestamentos, bastante vulneráveis aos incêndios naturais e/ou provocados pelo homem. Em reflorestamentos jovens, as árvores podem ser facilmente destruídas pelo fogo, enquanto árvores mais velhas, com maior espessura de caule, podem suportar altas temperaturas externas sem comprometimento do câmbio (SEITZ, 1992).

Efeitos de distúrbios naturais como o surgimento de clareiras e incêndios espontâneos, têm sido estudados quanto à regeneração natural e sobrevivência de espécies como a *Araucaria angustifolia* (NETTO; SANQUETTA; BRENA, 2006). Hipóteses evidenciam ser a espécie dependente do fogo para sua regeneração e domínio em seu próprio habitat, dada por suas características de flamabilidade e capacidade regeneradora em condições de distúrbio (SOARES, 1979; SEITZ, 1992).

Se por hora, o fogo auxilia a araucária a se regenerar, o aumento excessivo da frequência do mesmo em alguns fragmentos de suas florestas, principalmente no Estado de São Paulo, apresentam efeito desconhecido. Mudanças na composição de espécies de plantas em florestas desmatadas ou atingidas pelo fogo, podem modificar substancialmente a ciclagem biogeoquímica pela alteração da qualidade da liteira, através do seu fluxo de nutrientes, taxa de decomposição, e ainda, eficiência do dossel na filtragem de partículas finas de ar e absorção de nutrientes (BÉLANGER et al., 2004).

2.1.4 Efeito do reflorestamento e do fogo sobre atributos microbiológicos do solo

Em solos de ecossistemas florestais a qualidade e a quantidade do material orgânico que são depositados no solo são as principais responsáveis pela nutrição das espécies florestais. Hoogh e Dietrich (1979) salientam que a disponibilidade de nutrientes para as plantas depende das características biológicas do solo, sendo esta influenciada pelo conteúdo de matéria orgânica e taxa de mineralização, tendo a atividade microbiana um papel importante na nutrição da espécie *Araucaria*. As micorrizas do tipo vesicular-arbuscular detectadas por Milanez e Monteiro Neto (1950) e por Oliveira e Ventura (1952), possuem significativa importância na nutrição da araucária influenciando a decomposição da serapilheira e no fornecimento de N e P para a araucária (BLUM, 1980; BOWEN; SKINNER; BEVEGE, 1974; BOWEN; BEVEGE; MOSSE, 1975).

A utilização em larga escala de plantios puros de araucária em áreas anteriormente desmatadas pode promover alterações em parâmetros químicos, físicos e microbiológicos. Existe pouco conhecimento a respeito das modificações que poderiam ser provocadas pelo reflorestamento com espécies de araucária. Alguns estudos foram realizados com o objetivo de responder a esta lacuna, abordando levantamentos da diversidade de fungos micorrízicos (MOREIRA et al., 2006), fauna edáfica (BARETTA, 2007; MERLIN, 2005), e medidas do conteúdo de C e N da biomassa microbiana, respiração basal e atividade enzimática (CARVALHO, 2005), em Florestas de Araucária no Parque Estadual de Campos do Jordão, SP.

Para a araucária, os reflorestamentos apresentaram maior número de esporos de espécies de fungos micorrízicos arbusculares, quando comparados à área de floresta nativa, no outono e primavera, sem diferença significativa na taxa de colonização radicular para o outono, sendo os maiores valores de colonização encontrados para a área de floresta nativa apenas na primavera (MOREIRA et al., 2006). Para atributos da fauna edáfica, de maneira geral, os maiores valores foram encontrados na área de floresta nativa quando comparada às áreas reflorestadas impactadas ou não pela queima (BARETTA, 2007; MERLIN, 2005). Carvalho (2005) encontrou maiores valores para o carbono da biomassa microbiana (CBM) nas áreas de floresta nativa e reflorestamento queimado tanto no verão quanto no inverno, e maiores valores de nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) nas áreas de reflorestamento no inverno, e para a floresta nativa no verão. A autora não encontrou diferença quanto ao quociente metabólico entres as três áreas estudadas nas duas épocas de coleta; assim, como para a atividade enzimática de urease e hidrólise do diacetato de fluoresceína (CARVALHO, 2005). Diferenças significativas entre as áreas só foram encontradas no verão, para a atividade bioquímica das comunidades microbianas catalisadas através da enzima β -glicosidade, com os maiores valores encontrados na área de floresta nativa e reflorestamento não impactado pela queima, quando comparado ao reflorestamento com queima (CARVALHO, 2005).

Estudos mostram que desequilíbrios na microbiota do solo estão associados a fatores como o fogo, prejudicando os primeiros 15 cm da camada superficial do solo, o que promove alterações no solo e alterações no seu microclima (LIMA, 1996). A queima da matéria orgânica do solo provoca combustão de componentes nitrogenados e de ácidos orgânicos, retornando cátions inorgânicos como o potássio e o cálcio ao solo (GLIESSMAN, 2001). Todas essas

modificações de caráter abiótico promovem, conseqüentemente, alterações na composição biótica dos solos atingidos pelo fogo.

Dados sobre o efeito do fogo em ecossistemas naturais mostram uma redução imediata da população de quase todos os organismos do solo, incluindo fungos, bactérias nitrificadoras, aranhas, miriápodes e minhocas (BARETTA, 2007; GLIESSMAN, 2001). A morte de muitos destes organismos ocorre como resultado das altas temperaturas; assim, a intensidade, duração e freqüência dos incêndios, determinam a variação do impacto do fogo em ecossistemas naturais, bem como as alterações nas condições de pH e fluxo de nutrientes no solo após a incidência do fogo (BARETTA, 2007).

Carballas et al. (1994), verificaram que em florestas ácidas a ação do fogo espontâneo destrói a estrutura do solo aumentando a disponibilidade de nutrientes e o pH do solo, enquanto ocorre um decréscimo da disponibilidade do N e C orgânico, devido às formas de N e C remanescentes tornarem-se mais recalcitrantes ao ataque microbiano. Conseqüentemente, a densidade microbiana, biomassa e sua atividade também decresceram, e ocorre uma recuperação da população bacteriana mais rapidamente do que a população fúngica (CARBALLAS et al., 1994).

Para medidas de diversidade microbiana, Díaz-Raviña et al. (2006), encontraram em uma floresta de pinheiro na região da Galícia na Espanha, uma diminuição dos ácidos graxos ligados a ésteres de fosfolipídios (PLFAs) extraídos na área após o fogo, com uma diminuição da população de bactérias Gram-positivas e aumentos relativos de bactérias Gram-negativas. Baretta et al. (2005), encontraram alterações em parâmetros microbiológicos (CBM, C-CO₂, qCO₂ e relação CBM:COT) de solos sob reflorestamento com pinus, campo nativo e campo nativo queimado, quando comparados à mata nativa de *Araucaria angustifolia* na região do Planalto Sul Catarinense.

2.1.5 Diversidade microbiana do solo

Há muitos anos o homem busca locais com possibilidade de exploração agrícola, agregando novos pedaços de terra a sua rotina de cultivo de alimentos e de criação de animais, bem como a exploração do conjunto de riquezas naturais a ele disponível. Esta prática, responsável pela substituição do caráter nômade da raça humana a uma condição de fixação ao

seu local de cultivo foi aos poucos, promovendo perdas consideráveis na riqueza biológica de nossos ecossistemas naturais, as florestas (BUNNEY, 1990; KHATOUNIAM, 2001).

O solo é um sistema biológico dinâmico e complexo, onde diferentes organismos desempenham papéis fundamentais para a manutenção e a sobrevivência de comunidades vegetais e animais nos ecossistemas terrestres. Tais papéis são desempenhados por importantes funções que incluem: a mineralização da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes e energia (O'DONNELL et al., 2001; RICE; MOORMAN; BEARE, 1996; TIMONEN et al., 1996; YAO; WILSON; CAMPBELL, 2000), fixação do nitrogênio atmosférico (MELO; AZEVEDO, 1998), decomposição de xenobióticos (MELO; AZEVEDO, 1998; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006), e produção de compostos complexos responsáveis pela agregação de partículas do solo com melhoria de sua estrutura (DODD et al., 2000; GLOVER; REGANOLD; ANDREWS, 2000; TISDALL; OADES, 1982), além do controle biológico de pragas e doenças (FILION; STARANAUD; FORTIN, 1999; SMITH; GOODMAN, 1999).

Evidências mostram que muitas destas funções são redundantes, ou seja, podem ser realizadas por diferentes espécies de microrganismos, como por exemplo, a decomposição da matéria orgânica. A presença da redundância de funções no solo torna ainda mais importante o conceito de diversidade microbiana. Diversidade microbiana caracteriza-se pelo número de diferentes espécies de fungos e bactérias (riqueza) e sua relativa abundância na microflora do solo (ALTIERI, 1999; NANNIPIERI et al., 2003). A diversidade funcional da microbiota do solo é determinada pela diversidade genética, e esta pode ser utilizada como indicador da qualidade dos solos (LAMBASIS et al., 2005), permitindo o entendimento da complexidade da ligação entre diversidade microbiana e suas funções no solo e a compreensão das relações entre diversidade genética e a estrutura de comunidades (NANNIPIERI et al., 2003).

A microbiota é representada por um conjunto de organismos que incluem bactérias arqueias, fungos, algas e protozoários. Tais organismos apresentam diferenças fundamentais em nível celular que os permitem classificá-los em procariotos e eucariotos. O conceito de espécies para o estudo de diversidade de procariotos ainda não foi completamente estabelecido, aumentando a complexidade e dificuldade de se estudar tais organismos (GEVERS et al., 2005; ROSSELÓ-MORA; AMANN, 2001). A transferência horizontal que ocorre em bactérias permite aumentar significativamente a troca genética entre esses organismos, trazendo profundas

mudanças evolutivas (COHAN, 2002), dificultando a denominação pela ciência de características específicas necessárias a classificação de espécies em procariotos (LAMMEL, 2007).

Durante muitos anos, considerou-se, que a maior diversidade da vida na terra era devido aos eucariotos, particularmente, devido às suas formas multicelulares (WHITTAKER, 1969), enquanto, os procariotos eram considerados simples, primitivos e relativamente uniformes em suas características (HUGENHOLTZ; PACE, 1996). Este conceito começou a ser modificado há cerca de 20 anos, quando Carl Woese e seus colaboradores, baseados na análise de uma subunidade menor do RNA ribossomal, sugeriram que os organismos vivos fossem classificados em três grupos: *Archaea*, *Bacteria* e *Eukarya*. Tais grupos foram denominados domínios e surgiram através de vias evolutivas distintas a partir de um ancestral comum.

O domínio *Bacteria* inicialmente proposto por WOESE (1987), era formado por 11 filos compostos por indivíduos cultivados e caracterizados, sendo posteriormente, verificado através de técnicas independentes de cultivo, a presença de um número maior de filos, muitos destes com representantes não cultiváveis (De LONG; PACE, 2001). Hugenholtz, Goebel e Pace (1998) propuseram uma nova classificação baseada na inclusão de seqüências do gene rRNA 16S de organismos retirados diretamente do ambiente. Esta nova classificação aumentou-se o número de filos bacterianos para 36. Recentemente Rappé e Giovannoni (2003), baseados no estudo de seqüências do gene rRNA 16S amplificadas a partir do DNA total de amostras ambientais de diversos locais, sugerem 52 filos bacterianos, porém, apenas 24 são reconhecidos pelo Manual de Bergey, sendo que os solos aparentam ser dominados por pequeno número destes filos (GARRITY; BELL; LILBURN, 2004).

O domínio *Archaea* é formado por organismos adaptados a condições extremas e consiste de três divisões: *Crenarchaeota*, que contém as arqueias hipertermofílicas redutoras de enxofre; *Euryarchaeota*, que compreende uma grande diversidade de organismos, incluídas as espécies metanogênicas, as halofílicas extremas e algumas espécies hipertermofílicas; e *Korarchaeota*, uma divisão descrita recentemente, que engloba organismos hipertermofílicos pouco conhecidos, identificados a partir de seqüências do gene rRNA 16S isolados de fontes terminais terrestres, porém ainda não cultivados em laboratório (CARDOSO et al., 2003).

As *Archaea*, devido sua aparência externa muito se assemelham às bactérias mais comuns; porém, ao nível molecular aparentemente assemelham-se aos eucariotos, principalmente devido a sua maquinaria de informação genética (ALBERTS et al., 2004). No entanto, tornam-se

mais semelhantes às bactérias, principalmente em relação ao seu metabolismo de conversão de energia (ALBERTS et al., 2004). A comparação dos genomas seqüenciados de arqueias e bactérias permitem concluir que a principal diferença entre os domínios é devido à organização de seu sistema de processamento de informações genéticas (GAASTERLAND, 1999). Pouco se sabe sobre as funções que as arqueias desempenham nos ambientes onde são encontradas. Alguns estudos mostram grupos relevantes para o ciclo do C como é o caso dos metanogênicos (CADILLO-QUIROZ et al., 2006; GALAND et al., 2005; KOTSYURBENKO et al., 2004).

A diversidade de microrganismos e a complexidade das relações existentes entre diversidade microbiana no solo e seu papel funcional, permitem qualificar o ambiente solo como uma “fronteira final”, que abriga um universo microbiano desconhecido (CURTIS; SLOAN, 2005). Esta “fronteira final” torna-se ainda mais desconhecida, quanto mais complexo e inalterado for o ambiente solo.

A microbiota do solo tem sido estudada em diferentes ambientes, como: deserto polar (HOROWITZ; CAMERON; HUBBARD, 1972), elevadas altitudes (LEY; LIPSON; SCHMIDT, 2001), floresta boreal (HENCKEL et al., 2000; JAATINEN et al., 2004), trópicos (GOMES et al., 2001), mangues (CURY, 2002, 2006), desertos (BAILEY; SMITH; BOLTON, 2002), áreas poluídas e cultivadas (KANDELER et al., 2000), entre outros ambientes. Cada solo destes ambientes estudados abriga um conjunto de características complexas que determinam as especificidades para o condicionamento de sua maior ou menor diversidade, determinando os chamados *hot spots*. Os *hot spots* caracterizam-se por zonas preferenciais de atividade biológica como agregados com diferentes propriedades físico-químicas, zonas de acúmulo de matéria orgânica ou de resíduos animais, além da própria rizosfera do solo (AGNELLI et al., 2004; NANNIPIERI et al., 2003).

Os solos de florestas são por natureza ambientes preferenciais para a riqueza e abundância da microbiota, dada pela grande abundância de espécies vegetais e acúmulo de material orgânico. Nos solos pobres de ecossistemas florestais tropicais, a matéria orgânica do solo apresenta um papel condicionante para a manutenção da nutrição da vegetação de espécies florestais, que dependem da ciclagem de nutrientes contidos nos detritos vegetais da serapilheira (HERRERA et al., 1978). A sucessão natural de espécies pioneiras em ecossistemas florestais determina a grande variabilidade de vegetação, associada a uma alta diversidade microbiana e da fauna do

solo (MARSHALL, 2000). Essa elevada diversidade microbiana pode ser atribuída ao aporte de restos vegetais no solo e a riqueza de exsudados radiculares (WALLWORK, 1970).

Estima-se que em 1 m² de solo de floresta possa conter mais de 2.000.000 de metazoários e mais de 1.000.000 de protozoários, representando 1.000 ou mais espécies (Marshall, 2000). Cerca de 10.000 espécies de fungos vivem no solo, sendo que a sua biomassa em solos de florestas pode ser maior do que 1 kg m² (MARSHALL, 2000). Solos de florestas podem abrigar milhares de espécies de bactérias, incluindo actinobactérias filamentosas, e contribuindo para uma elevada diversidade funcional destes organismos encontrados (MARSHALL, 2000). Estudos da diversidade microbiana em ambientes naturais são importantes para o entendimento e compreensão dos processos ecológicos que governam o seu funcionamento, e do papel funcional dessa diversidade, além de identificar alterações ambientais associadas a distúrbios e aumentar o conhecimento sobre os recursos genéticos disponíveis (KENNEDY; SMITH, 1995).

2.1.6 Métodos de avaliação de comunidades microbianas do solo

Esforços foram realizados pelos microbiologistas do solo para identificar os microrganismos que vivem nesse complexo ambiente. Entretanto, a maioria das bactérias obtidas de amostras ambientais não pode ser cultivada em meios artificiais (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995), sendo que apenas uma pequena porção da comunidade microbiana é avaliada. Além, disso muitos destes microrganismos que crescem em meios artificiais não são metabólica ou numericamente dominantes no meio natural de onde provêm (MUYZER; RAMSING, 1995), podendo ser selecionados por sua habilidade de desenvolvimento em meios aeróbios e com altas concentrações de nutrientes (HUGENHOLTZ, 2002). Estima-se que 80 a 99% dos microrganismos do solo permaneçam sem identificação (ALEXANDER, 1977).

Devido aos avanços das técnicas moleculares, bioquímicas e fisiológicas para o estudo de comunidades microbianas dos solos, tornou-se possível, avaliar a diversidade, composição e funcionamento destas comunidades complexas. A aplicação destas técnicas tem possibilitado a compreensão do papel funcional da diversidade microbiana dos solos, sua composição e variabilidade nos ecossistemas florestais, em resposta aos distúrbios e atividades de manejo destes ecossistemas (LECKIE, 2005).

2.1.6.1 Biomassa microbiana do solo, atividade respiratória e quociente metabólico

A biomassa microbiana do solo (BMS) é definida como o componente microbiano vivo composto por bactérias, fungos, microfauna e algas, sendo a principal responsável pela decomposição dos resíduos orgânicos, ciclagem de nutrientes, fluxo de energia, transformação da matéria orgânica e imobilização temporária de nutrientes e C (FEIGL; CERRI; BERNOUX, 1998; GAMA-RODRIGUES, 1999; WARDLE; HUNGRIA, 1994).

A atividade de algumas enzimas do solo (p.e. proteases, fosfatases, ureases) (BRUSSARD et al., 2004) e a quantificação da BMS por meio de atributos como o teor de carbono e nitrogênio nela contidos (CBM e NBM) e a determinação de sua atividade pela liberação do C-CO₂ (respiração basal), ou ainda, a determinação de relações como o quociente metabólico (qCO_2), relações entre o CBM e o carbono orgânico total (COT) e entre o NBM e o nitrogênio total (NT) do solo (relações CBM:COT e NBM:NT), respectivamente, tem sido usadas no estudo dos processos de ciclagem e transformação de nutrientes, bem como, para aferir atributos qualitativos da dinâmica da matéria orgânica dos solos (ANDERSON, 2003; DALAL, 1998; GAMA-RODRIGUES, 1999), permitindo identificar possíveis padrões de qualidade do solo, considerando o importante papel desempenhado pela biomassa microbiana nos agroecossistemas (CATTELAN, 1989; GAMA-RODRIGUES, 1999; LAL, 1999; WARDLE; HUNGRIA, 1994), além de mudanças decorrentes do manejo.

2.1.6.2 Capacidade de utilização de substratos de carbono (Biolog)

A capacidade de utilização de substratos de carbono (Biolog) é considerada uma aproximação rápida e simples para a caracterização e comparação de comunidades microbianas do solo baseada em sua capacidade heterotrófica. O método Biolog proposto por Garland e Mills (1991), utiliza microplacas contendo 96 poços, sendo 95 deles preenchidos por diferentes substratos de carbono e um poço controle sem carbono (BIOLOG Inc., HAYWARD, CA). Insam (1997) refinou o uso desta técnica pela utilização das chamadas microplacas Ecoplate[®] compostas de 31 diferentes fontes de substratos repetidas três vezes em cada placa (CAMPBELL; GRAYSTON; HIRST, 1997).

O desenvolvimento da cor nos poços reflete a atividade e a densidade das espécies, bem como a habilidade das comunidades microbianas em responder a um substrato particular, refletindo em sua diversidade metabólica. A diversidade metabólica microbiana pode ser definida como a capacidade da comunidade microbiana de utilizar diferentes tipos de fontes de carbono como substrato e tem mostrado sensível a mudanças ambientais (KANDELER; KAMPICHLER; HORAK, 1996; ZAK et al., 1994).

Inúmeros estudos demonstraram que a capacidade de utilização de substratos medida pelo sistema Biolog, é capaz de distinguir comunidades microbianas através de mudanças sazonais (COSTA, 2006; PAPATHEODOROU; ARGYROPOULOU; STAMOU, 2004), mudanças em função de diferentes práticas de manejo agrícola (BENDING et al., 2004; BUCHER; LANYON, 2005) e de pastagens (INSAM et al., 1996), além de estudos de ecossistemas florestais (GOBERNA et al., 2005; LAVERMAN et al., 2005).

O método Biolog depende de organismos ativos em condições de laboratório, e os perfis podem primeiramente refletir na seleção de populações microbianas de rápido crescimento, criando certa dificuldade na relação dos dados obtidos *in vitro* para o funcionamento de comunidades microbianas em sistemas naturais (LECKIE, 2005; PRESTON-MAFHAM; BODDY; RANDERSON, 2002). No entanto, o método pode ser usado como um *screening* da estrutura de comunidades quando da sua combinação com outros métodos, entre eles métodos moleculares e bioquímicos, permitindo a obtenção da compreensão da relação entre estrutura de comunidade e seu funcionamento (GRAYSTON et al., 2001).

2.1.6.3 Perfis de ácidos graxos ligados a ésteres de fosfolipídios (PLFAs)

Os ácidos graxos ligados a ésteres de fosfolipídios (PLFAs) permitem uma visualização da estrutura fenotípica de comunidades microbianas pela sua descrição baseada nas relações de filogenia de microrganismos e seus perfis de PLFAs. O método baseia-se na extração, fracionamento, metilação e cromatografia dos fosfolipídios componentes dos lipídios do solo (NANNIPIERI et al., 2003), os quais servem para a caracterização da estrutura de comunidades microbianas do solo, pela variabilidade de ácidos graxos presentes na membrana celular de diferentes microrganismos, sendo rapidamente degradados no solo após a sua morte celular (FEDERLE, 1986; WHITE et al., 1979).

A proporção constante de PLFAs específicos na biomassa de células, bem como a variação nos ácidos graxos entre diferentes grupos taxonômicos resultam em marcadores que podem ser utilizados para interpretar perfis de comunidades microbianas no solo (IBEKWE; KENNEDY, 1998). Diferentes grupos de bactérias são caracterizados por ácidos graxos ligados a ésteres de fosfolipídios específicos, e uma mudança na estrutura destas comunidades pode ser caracterizada por mudanças nos padrões da composição de PLFAs do solo. Desta maneira, o conteúdo de PLFA tem se correlacionado com outras medidas de biomassa microbiana em solos florestais (BAILEY; SMITH; BOLTON, 2002; LECKIE et al., 2004; ZELLES et al., 1992), sendo um bom determinante da identificação de estruturas microbianas, bem como da alteração das mesmas por distúrbios naturais e antropogênicos (DÍAZ-RAVINÃ et al., 2006; FROSTERGÅRD; BÁÁTH, 1996; HACKL et al., 2005; GRAYSTON; PRESCOTT, 2005; GRAYSTON; RENNENBERG, 2006).

Mudanças nos perfis de fosfolipídios são geralmente relacionadas a variações na abundância de grupos microbianos e podem ser interpretadas por referências a bancos de dados de culturas puras ou vias biosintéticas conhecidas (ZELLES, 1999). No entanto, o método PLFA não permite a identificação de espécies e pode somente ser utilizado para estimar a mudança total na estrutura de comunidades (NANNIPIERI et al., 2003).

A técnica PLFA pode ser mais sensível na detecção de mudanças nas comunidades microbianas do que a técnica Biolog. Isso se relaciona, provavelmente, ao fato do PLFA medir a comunidade microbiana inteira, enquanto o método Biolog somente mede uma fração da comunidade microbiana cultivável (IBEKWE; KENNEDY, 1998). No entanto ambos os métodos, PLFA e Biolog, quando associados por diferentes técnicas de análise estatística multivariada, permitem diminuir as limitações relacionadas aos métodos, aumentando a capacidade de interpretação e da utilização dos dados (PRESTON-MAFHAM; BODDY; RANDERSON, 2002).

2.1.6.4 Medida da diversidade microbiana através de técnicas moleculares

A análise da estrutura das comunidades microbianas baseada na extração do DNA diretamente do solo, têm prometido resolver muitas dúvidas relacionadas ao modo com que as diferentes perturbações (naturais e antropogênicas) podem afetar as populações de

microrganismos, e principalmente, criando bases para a compreensão das relações existentes entre diversidade microbiana e suas funções no solo. As técnicas moleculares geralmente envolvem a extração de ácidos nucleicos do solo e amplificação de regiões específicas do DNA por PCR, permitindo o estudo e identificação de microrganismos. O seqüenciamento dessas regiões com posterior comparação dessas seqüências com seqüências depositadas em banco de dados públicos tem revelado um grande número de microrganismos nunca antes conhecidos (BORNEMAN; TRIPLETT, 1997).

O gene comumente amplificado para esse propósito entre os procariotos é o que codifica a subunidades 16S do RNA ribossômico (rDNA 16S). O estudo das seqüências do rDNA 16S tornou-se padrão na determinação de relações filogenéticas, avaliação da diversidade em amostras ambientais e detecção e quantificação de populações específicas (HEAD; SAUNCER; PICKUP, 1998; KIRK et al., 2004). A escolha da seqüência de nucleotídeos do rDNA 16S decorre do fato da mesma agrupar um conjunto de características necessárias a um bom marcador molecular, a qual inclui a sua distribuição universal, estrutura e função conservada entre os táxons, ausência de transferência lateral, e tamanho grande o suficiente (cerca de 1.500 nucleotídeos) para estudos de filogenia (AMANN; LUDWIG, 2000). Sua estrutura primária possui uma alternância entre regiões mais ou menos conservadas, permitindo a investigação de um amplo espectro de distâncias filogenéticas, desde o nível de domínio até espécie (LUDWIG; SCHLEIFER, 1994). O grande número de seqüências do rDNA 16S atualmente disponíveis em bancos de dados públicos, permite ainda um maior uso deste gene como marcador filogenético (MACRAE, 2000).

Para o estudo da organização das comunidades microbianas a técnica de PCR-DGGE (eletroforese em gel com gradiente desnaturante), tem sido muito empregada. Esta técnica foi originalmente desenvolvida para a identificação de mutações pontuais nas seqüências de DNA, e teve seu uso expandido por Muyzer, Waal e Uitterlinden (1993), no estudo da diversidade genética microbiana. A técnica de PCR-DGGE baseia-se na separação de fragmentos de fita dupla do DNA de mesmo tamanho, porém com seqüências divergentes, em gel contendo acrilamida a uma concentração constante e, um gradiente de uréia e formamida (ROSADO; DUARTE, 2002). Na separação do DNA no gradiente desnaturante os fragmentos irão migrar diferencialmente, de acordo com o seu teor de G+C (MUYZER; SMALLA, 1999). No entanto, fragmentos de diferentes seqüências podem ter características similares de mobilidade no gel, e

uma banda pode não necessariamente representar um único *amplicom* (GELSOMINO et al., 1999).

Usando-se PCR-DGGE, pode-se detectar aproximadamente 50% das variações de seqüências em fragmentos de DNA com até 500 pares de bases (MYERS et al., 1985), podendo esta percentagem alcançar aproximadamente 100% quando se acrescenta a um dos lados do fragmento de DNA um segmento rico em GC (*GC-clamp*) (SHEFFIELD; COX; MYERS, 1989), o qual impede a dissociação das duas fitas de DNA durante a eletroforese. A técnica mostra-se como uma ferramenta eficiente na detecção de mudanças na estrutura de comunidades microbianas em função de alterações ambientais, causadas por práticas de manejo e/ou associação à variabilidade de atributos mensurados nas áreas (CLEGG, 2006). Em solos florestais, a técnica de PCR-DGGE tem se apresentado útil na identificação de diferentes padrões na estrutura de comunidades, refletindo em uma alta diversidade (AGNELLI et al., 2004; HENCKEL et al., 2000; LAVERMAN et al., 2005; NOGUEIRA et al., 2006).

Complementando os dados obtidos através da análise dos perfis de *amplicons* obtidos pela técnica PCR-DGGE, pode-se utilizar de abordagens alternativas para a caracterização de comunidades microbianas complexas. Entre elas tem-se o seqüenciamento de clones de rDNA, que consiste na amplificação de fragmento específico do gene rRNA 16S, sua clonagem em vetor apropriado e o posterior seqüenciamento dos insertos obtidos (LAMBALIS et al., 2005).

O uso de seqüências do gene rRNA 16S permite o acesso à caracterização de diferenças entre comunidades microbianas do solo, revelando consistência analítica e alta capacidade de processamento e fornecimento de dados compatíveis para padrões de avaliação estatística (HARTMANN; WIDMER, 2006). A clonagem e o seqüenciamento do gene rRNA 16S (JANSSEN, 2006; VENTER, 2004; WIDMER et al., 1999) combinados com abordagens estatísticas satisfatórias (BOHANNAN; HUGHES, 2003; STALEY, 1997), podem fornecer informações detalhadas da composição e diversidade das comunidades microbianas.

A estimativa de diversidade por definição de unidades taxonômicas operacionais (UTOs) em diferentes níveis de seqüências identificadas de clones do gene rRNA 16S, apresenta-se uma utilização comum em ecologia microbiana (GEVER et al., 2005; SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005; WOESE, 1987). Normalmente, aceita-se o limite de 97% de similaridade para a separação de espécies, mas sugere-se o uso de diversos genes quando da necessidade de uma maior resolução taxonômica (GEVERS et al., 2005). A definição do limiar de similaridade entre

seqüências apresenta-se como uma etapa limitante para o agrupamento das mesmas, principalmente, devido, a inexistência consensual literária sobre o grau de similaridade entre as seqüências de rDNA 16S para a definição de UTOs (LAMBAIS et al., 2005).

A utilização de algoritmos específicos para o processamento das seqüências geradas permite sua posterior utilização em diferentes tipos de análises, entre elas, o estabelecimento de afiliações taxonômicas através de comparações com seqüências depositadas em bancos de dados públicos como o GenBank do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e o *Ribossomal Database Project* (RDP). Pesquisadores do SIMO (*Sapelo Island Microbial Observatory*) da Universidade da Geórgia, EUA, criaram o programa RDPquery (2006), um aplicativo Java para recuperação de identificações taxonômicas de seqüências do gene rRNA 16S, através da criação de alinhamentos e realização de comparações com dados de seqüências.

As seqüências podem ainda, ser submetidas a alinhamentos múltiplos para determinação do grau de similaridade entre elas, utilizando-se programas como o PHYLIP (FELSESTEIN, 1993) ou PAUP (SWOFFORD, 2003) para análises filogenéticas, caracterização e comparação da diversidade microbiana entre diferentes bibliotecas (LAMBAIS et al., 2005). No ano de 2005, Schloss e Handelsman, desenvolveram o DOTUR (*Distance Based OTU and Richness Determination*) que utiliza a matriz de distância gerada pelo programa PHYLIP como arquivo de entrada, e permite a definição de UTOS em um conjunto de seqüências, de maneira rápida e confiável. O DOTUR permite ainda, o cálculo de valores utilizados para construção de curvas de rarefação, estimadores de riqueza e índices de diversidade.

Estimadores de riqueza não-paramétricos como: Chao 1 (CHAO, 1987) e o ACE (*Abundance-based Coverage Estimator*) (CHAO; LEE, 1992), e índices de diversidade como: Shannon (H) e Simpson utilizam diferentes aproximações matemáticas para estimar a diversidade, dando medidas quantitativas da maior ou menor diversidade encontrada nas amostras e/ou áreas. Embora os índices e estimativas de diversidade e riqueza possam dar medidas da composição da riqueza de indivíduos encontradas em diferentes bibliotecas de diferentes áreas e/ou tratamentos, eles não asseguram a composição das diferentes áreas, e não permitem aferir sobre diferenças encontradas para o conjunto de seqüências de diferentes bibliotecas. Para tal utiliza-se o programa S-LIBSHUFF (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005), que permite realizar comparações entre seqüências de bibliotecas de rDNA 16S determinando a significância estatística entre as mesmas a diferentes distâncias filogenéticas.

Como já citado, estudos da diversidade genética de microrganismos, entre eles, bactérias, em Florestas de Araucária são inexistentes, principalmente para região mais diminuta de sua extensão, que abriga o Estado de São Paulo. O emprego da utilização das diferentes técnicas mencionadas no item 2.1.6 permitirá uma análise exploratória da diversidade microbiana e da estrutura das comunidades microbianas no solo das Florestas de Araucária, natural ou impactadas, podendo contribuir para uma melhor compreensão dos processos ecológicos do bioma araucária, e criação de estratégias de recuperação e preservação desta espécie.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a diversidade, funcionalidade e estrutura das comunidades microbianas, principalmente bactérias, em florestas de *Araucaria angustifolia* natural, introduzida e impactada pela queima acidental.

2.2.2 Objetivos específicos

a) Comparar as estruturas das comunidades de *Bacteria e Archaea* e sua distribuição em solos de florestas com *Araucaria angustifolia* natural, introduzida e impactada pelo queima acidental, utilizando DGGE de fragmentos da região V₃ do gene rRNA 16S;

b) Estimar a riqueza de espécies e a distribuição dos diferentes táxons através do seqüenciamento de clones da região V₁-V₃ do gene rRNA 16S;

c) Identificar diferenças entre as áreas estudadas com base em atributos químicos (pH_{CaCl2}, P, Ca, Mg, K, H+Al e conteúdo de MO) e microbiológicos (CBM, C-CO₂, qCO₂ e relação CBM:COT), por meio da análise canônica discriminante (ACD);

d) Avaliar a capacidade potencial metabólica das comunidades microbianas das diferentes áreas de Floresta de Araucária, por meio da análise da capacidade de utilização de fontes de C (Biolog), bem como sua estrutura genética por meio de comparações de seus perfis de ácidos graxos ligados a ésteres de fosfolipídios (PLFAs);

e) Testar o uso de técnicas multivariadas para o estudo do comportamento da diversidade dos microrganismos, entre eles *Bacteria* e *Archaea*, utilizando os atributos químicos e microbiológicos como variáveis ambientais explicativas;

f) Correlacionar alguns atributos químicos e microbiológicos do solo, com a diversidade de microrganismos encontrada nas Florestas de Araucária sob diferentes estados de conservação.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Descrição da área de estudo

O presente estudo foi realizado no Parque Estadual de Campos de Jordão (PECJ), município de Campos do Jordão, SP, localizado na Serra da Mantiqueira, a uma altitude média de 1.700 m; tendo como posição geográfica determinada pelas coordenadas de 22° 44' de latitude Sul, e 45° 30' de latitude Oeste de Greenwich (Figura 1).

O município apresenta clima subtropical de altitude, mesotérmico úmido (Cfb) segundo a classificação de Köppen, caracterizado pela ausência de nebulosidade úmida, ventos constantes e chuvas excessivas, com média anual de temperatura de 13,1°C. No mês de fevereiro o município alcança sua época mais quente, com uma média de 16,6°C, e no mês mais frio, julho, registra 8,6°C (SEIBERT et al., 1975; MANTOVANI, 2003).

Como característica da região, as chuvas apresentam sua maior distribuição durante o período mais quente, tendo na estação de verão as maiores médias pluviométricas, principalmente no mês de janeiro, sendo o período denominado de “estação úmida” (MANTOVANI, 2003). Para a estação fria (inverno), a baixa frequência de precipitação denomina o período como “estação seca”, ocorrendo as maiores estiagens nos meses de junho (MANTOVANI, 2003). As médias das temperaturas máximas e mínimas mensais para os períodos de coletas foram de: 24 e 8°C, respectivamente, para a 1ª coleta (setembro de 2004), e 23,1 e 13,5°C, respectivamente, para a 2ª coleta (dezembro de 2006) (Figura 2A e B). A média mensal de precipitação pluviométrica para os períodos de coleta é apresentada na Figura 2. A precipitação total nos meses de coleta foi de 31 e 282,3 mm, respectivamente, na 1ª e 2ª coleta.

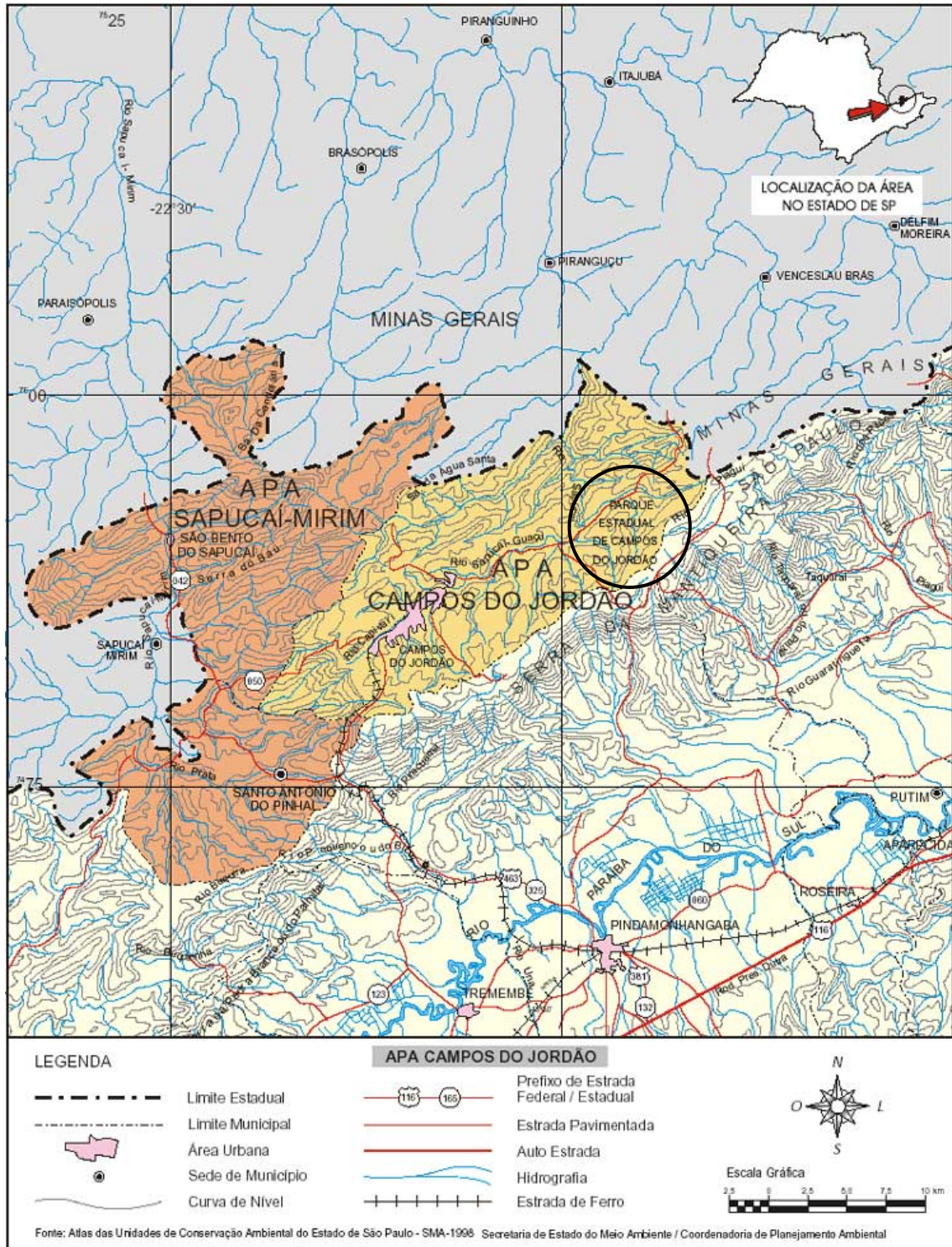


Figura 1 – Localização do Parque Estadual de Campos do Jordão (PECJ) dentro do município de Campos do Jordão, SP. Fonte: Atlas das Unidades de Conservação Ambiental do Estado de São Paulo – SMA. http://www.camposonline.com.br/mapas/mapa_apa.htm

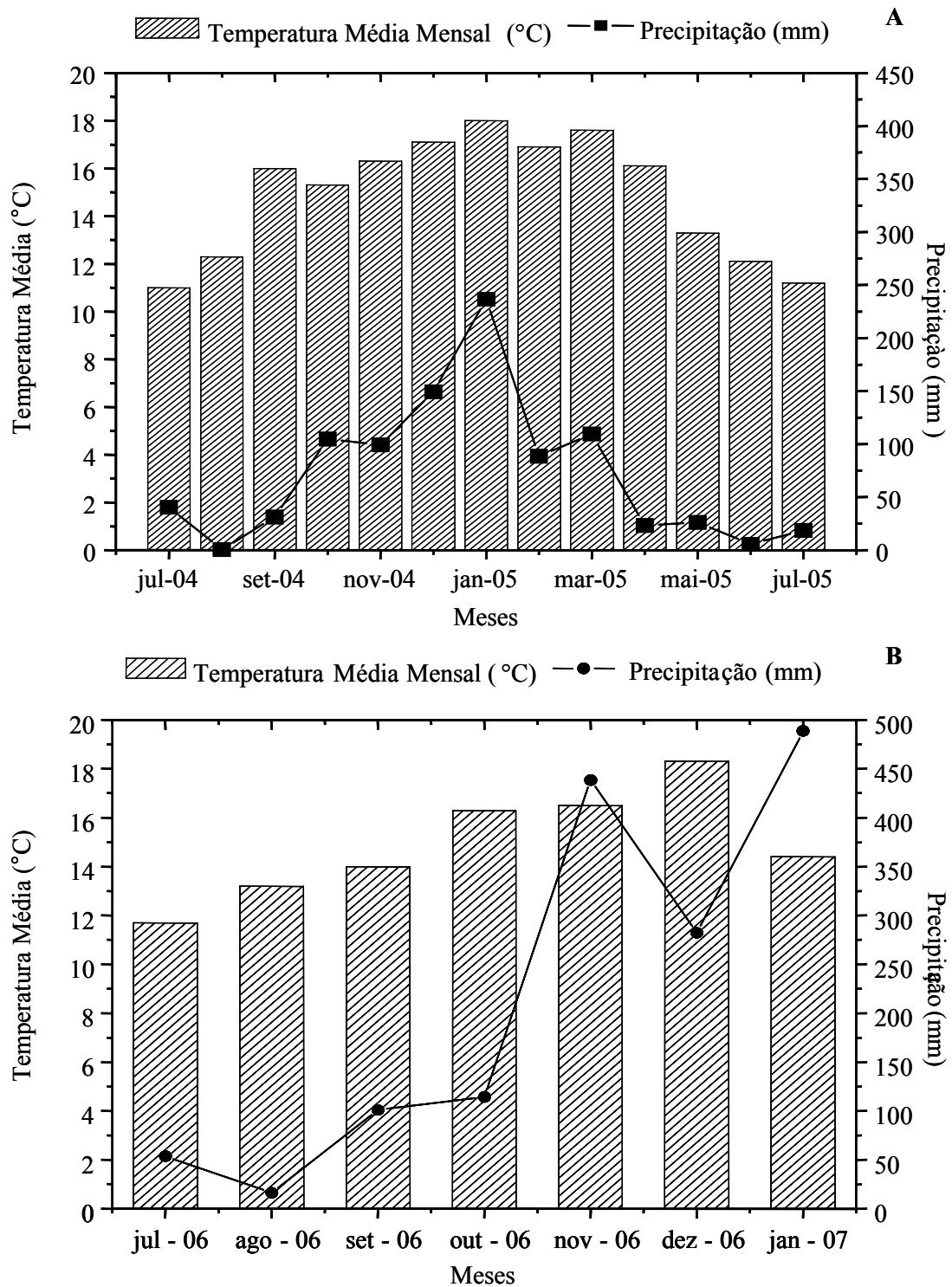


Figura 2 – Temperatura média mensal (°C) e precipitação pluviométrica mensal (mm), registradas no município de Campos do Jordão, SP, no período de julho de 2004 a julho de 2005, com a 1ª coleta em setembro de 2004 (A), e julho de 2006 a janeiro de 2007, com a 2ª coleta em dezembro de 2006 (B). Dados fornecidos pela estação meteorológica de Campos do Jordão

O PECJ, ou Horto Florestal, é o mais antigo do Brasil, distante aproximadamente 13 km da região central do município, e abrangendo uma área de 8.341 hectares. Ocupa um terço da superfície total da Estância de Campos do Jordão que é considerada uma das maiores reservas remanescentes da Floresta Ombrófila Mista ou Floresta de Araucária. O relevo da região é muito acidentado, apresentando declives superiores a 45%. Seu ponto mais alto fica a 2.007 m de altitude na borda sudoeste do planalto, e sua parte mais baixa a 1.030 m de altitude no vale do rio Sapucaí – Guaçu (SEIBERT et al., 1975).

Do ponto de vista florístico, a região de Campos do Jordão é marcada pelo encontro de três regiões principais: a Mata de *Araucaria-Podocarpus*; Campos do Brasil Central e Mata Latifoliada da Encosta Atlântica. A Mata de *Araucaria-Podocarpus* recobre as maiores extensões dentro do PECJ, sendo caracterizada pela grande densidade de *Podocarpus lambertii* Klotz. e *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) O. Ktze, concentrados em vales e grotões com maior grau de umidade e solos mais protegidos (BERZAGHI, 1994; MERLIM, 2005).

Para auxiliar na escolha das áreas de florestas de araucária natural ou introduzida integrantes do PECJ foi realizado um reconhecimento preliminar com diversas avaliações. Dentre as avaliações destacam-se: a determinação da altitude, declividade, profundidade do solo, densidade populacional de *Araucaria angustifolia* e um levantamento preliminar do diâmetro na altura do peito (DAP) das árvores, procurando assim, florestas de araucária com características similares entre si.

As áreas estão localizadas em posição similar de toposequência, em um terreno suave ondulado com declividade média de $0,1702 \text{ m m}^{-1}$, apresentando iguais condições quanto ao clima e ao solo, caracterizado como Latossolo vermelho-amarelo distrófico de textura argilosa (EMBRAPA, 1999). Para o presente trabalho, foram selecionadas três áreas representativas de florestas de araucária em vários estados de conservação (natural e introduzidas), dentro do PECJ, com aproximadamente 0,3 hectares cada, sendo: 1. floresta nativa com predomínio de araucária (FN), em condição clímax e com baixa interferência antrópica, elevada densidade de *Araucaria angustifolia* e *Podocarpus lambertii*, muito rica em epífitas, musgos, pteridófitas e *Bromeliaceae*, além de espécies arbóreas como: *Prunus sellowii*, *Cedrela fissilis*, *Drymis Winterii*, *Picramnia parvifolia*, entre outras (Figura 3A); 2. reflorestamento de araucária (RF); implantado no ano de 1959 a área apresenta a maior densidade de araucária, e tendo, devido às condições de luminosidade impostas pelo espaçamento entre árvores de araucária e *Podocarpus lambertii*,

predomínio de espécies vegetais arbustivas e herbáceas, com pastejo de bovinos e eqüinos na área (Figura 3B); 3. reflorestamento de araucária com queima (RQ), implantado no mesmo ano do reflorestamento anterior, a área sofreu um incêndio acidental intenso em meados de julho de 2001 e apresenta-se em estado de regeneração, com uma menor densidade de araucária quando comparada ao reflorestamento anterior, e um grande número de espécies gramíneas, além de entrada de animais na área para pastejo (Figura 3C).

A floresta nativa (FN) é composta basicamente por *A. angustifolia* (Bert.) O. Ktze e por diversas espécies arbustivas, herbáceas e arbóreas pertencentes às famílias *Araucariaceae*, *Clethraceae*, *Cunnoniaceae*, *Lauraceae*, *Melastomataceae*, *Podocarpaceae*, *Rosaceae*, *Symplocaceae*, *Myrsinaceae* e *Euphorbiaceae*. A área de RF apresenta várias árvores de *Podocarpus lambertii* Klotz, mas a predominância é das mesmas espécies de araucária da FN. Devido ao incêndio, a área RQ apresenta menor densidade de araucária e um predomínio da gramínea *Aristida longiseta*, da composta *Braccharis trimera* e do gênero *Paspalum*. Os dois reflorestamentos de araucária (RF e RQ) são pastejados por bovinos, comportando baixas lotações. Um levantamento completo da diversidade florística das áreas está sendo conduzido, e indica uma maior riqueza de espécies vegetais de diversas famílias e gêneros presentes na área de FN seguida do RQ (informação pessoal). A área RF apresenta a menor diversidade vegetal das três áreas estudadas (informação pessoal). Maiores informações sobre a flora arbórea, arbustiva e herbácea do PECJ podem ser obtidas em Robim et al. (1990).

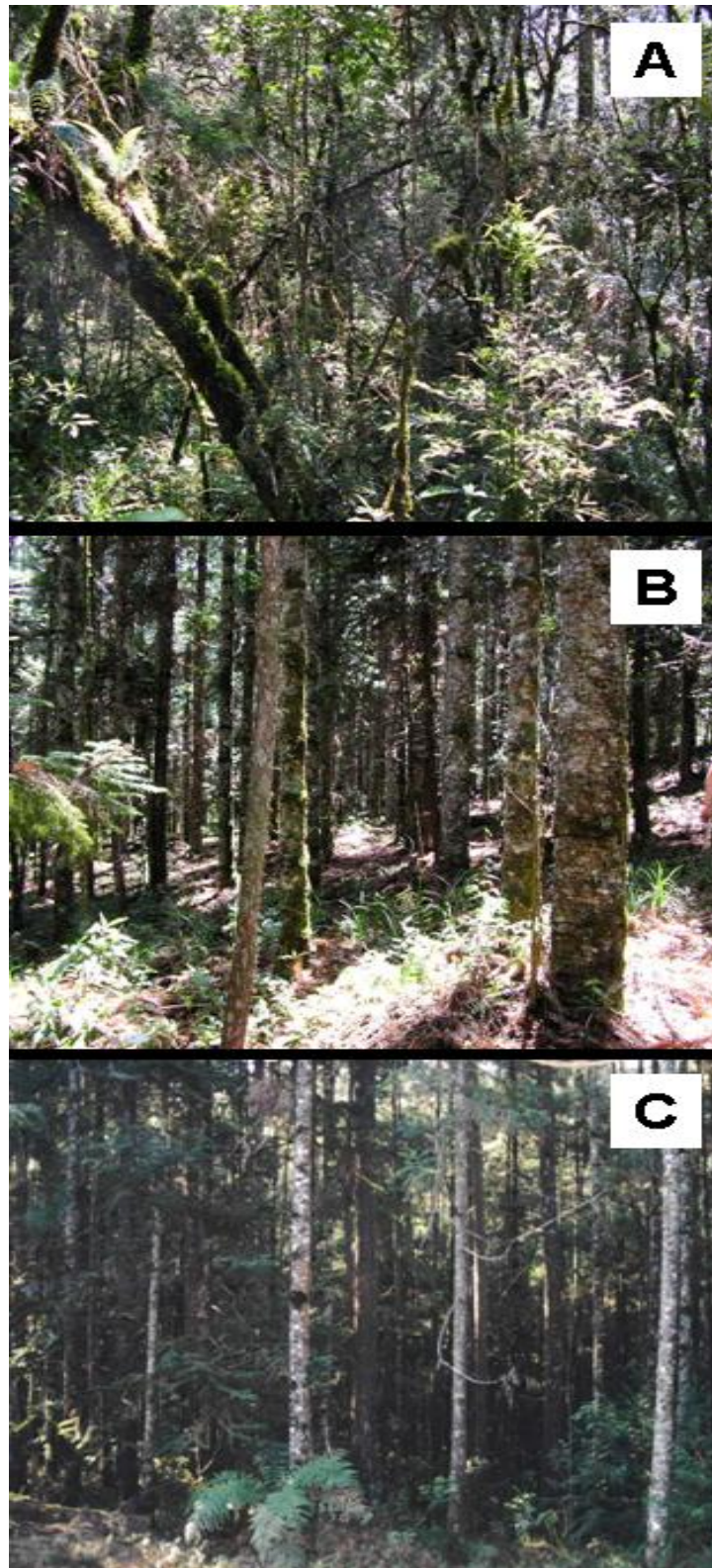


Figura 3 – Floresta nativa com predomínio de araucária – FN (A), reflorestamento de araucária - RF (B) e reflorestamento de araucária com queima - RQ (C), no PECJ, setembro de 2004

As áreas amostradas foram georeferenciadas usando um GPS modelo Garmin Etrex. A floresta nativa (FN) localiza-se a $22^{\circ} 41' 29''$ latitude Sul e $45^{\circ} 27' 52''$ longitude Oeste, com altitude média de 1.467 m; o reflorestamento de araucária (RF) localiza-se a $22^{\circ} 39' 31''$ latitude Sul e $45^{\circ} 26' 34''$ longitude Oeste, com altitude média de 1.559 m; e o reflorestamento com queima (RQ) localiza-se a $22^{\circ} 39' 49''$ latitude Sul e $45^{\circ} 26' 58''$ longitude Oeste, com altitude média de 1.549 m (Figura 4).

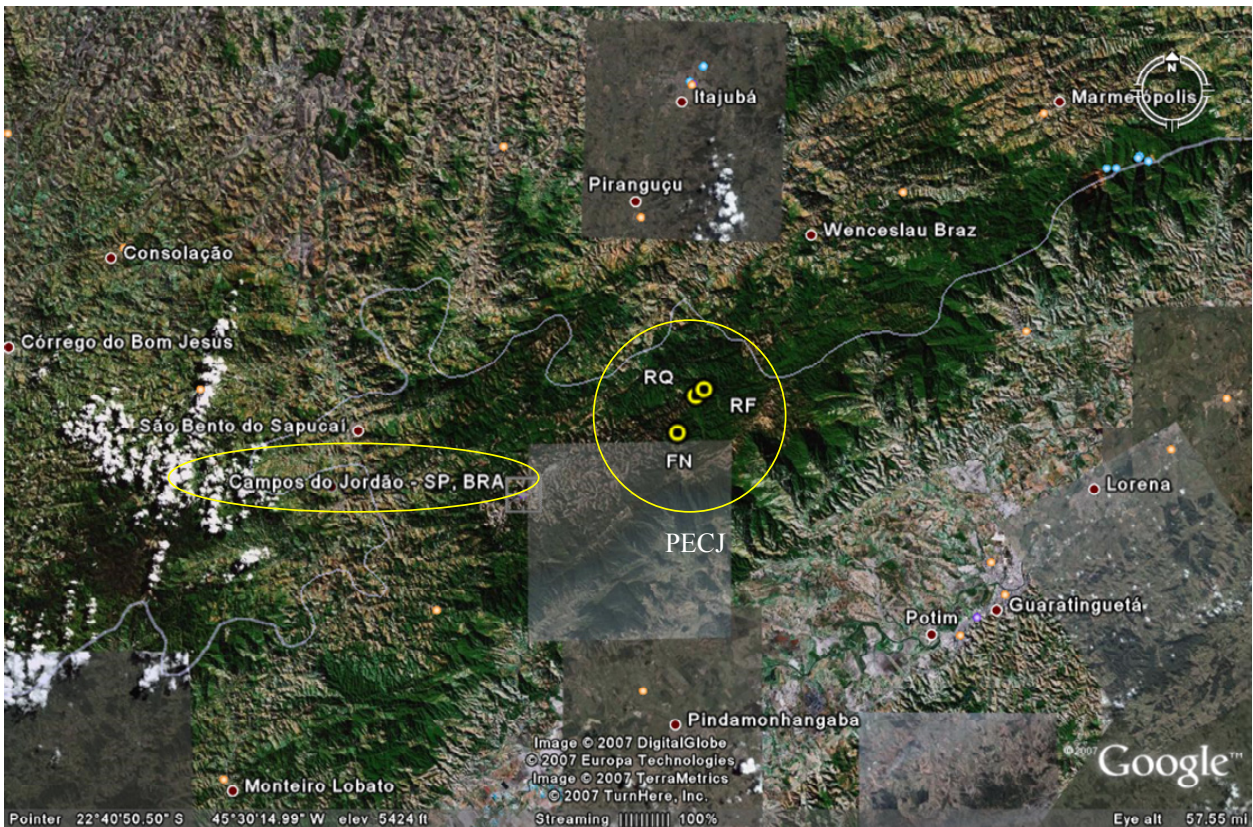


Figura 4 - Visão parcial com a localização das áreas de araucária dentro do PECJ, localizado na Serra de Campos do Jordão, município de Campos do Jordão, SP. Floresta nativa com predomínio de araucária (FN) ($22^{\circ}41'29''$ S e $45^{\circ}27'52''$ W), reflorestamento de araucária (RF) ($22^{\circ}39'31''$ S e $45^{\circ}26'34''$ W) e reflorestamento de araucária com queima (RQ) ($22^{\circ}39'49''$ S e $45^{\circ}26'58''$ W)

2.2.2 Esquema experimental

Devido à homogeneidade das áreas selecionadas, sem variabilidade visível, utilizou-se o princípio da casualização e da repetição. Em cada área de estudo foi demarcada uma parcela de

0,3 hectares, excluindo-se o efeito de bordadura, onde foram selecionadas ao acaso 10 árvores de *Araucaria angustifolia*, em um delineamento inteiramente casualizado. A distância entre linhas de plantio quando presentes, e entre as árvores escolhidas nunca foi superior a 15 e inferior a 5 metros. As áreas selecionadas apresentam diâmetro na altura do peito (DAP) médio de 120 cm para as árvores da FN, e 95 cm para as árvores do RF e RQ. As amostras de solo para avaliação dos atributos químicos e microbiológicos foram coletadas entre 1 e 2 m de distância do tronco de cada árvore selecionada ao acaso.

2.2.3 Amostragem

A primeira coleta foi realizada no PECJ durante a estação seca do ano de 2004 nos dias 13, 14 e 15 do mês de setembro. Em cada área de amostragem: floresta nativa (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento com queima (RQ) foi coletado 30 amostras de solo de aproximadamente 1 kg cada, sendo cada amostra coletada em três pontos distintos em torno de cada árvore, selecionada ao acaso, na profundidade de 0-20 cm. Para a coleta das amostras foi utilizado um trado, sendo este lavado e posteriormente desinfetado superficialmente com álcool após cada amostragem.

As direções de amostragem obedeceram ao proposto pelo protocolo do projeto BIOTA/FAPESP (2004) intitulado “Biodiversidade vegetal e de organismos edáficos em ecossistemas de *Araucaria angustifolia* naturais e impactados no Estado de São Paulo”, sendo estas: Norte-N (0°), Leste-sudoeste-ESE (112,5°) e Oeste-sudoeste-OSO (247,5°).

Uma segunda amostragem foi realizada na mesma área, durante a estação chuvosa do ano de 2006 (12 de dezembro) para a análise da estrutura das comunidades microbianas através do perfil de ácidos graxos ligados a ésteres de fosfolipídios (PLFA) e capacidade de utilização de substratos de carbono (Biolog). O mesmo procedimento de amostragem foi adotado para a segunda coleta, sendo amostrados os mesmos pontos da primeira coleta.

2.2.4 Processamento das amostras

As amostras da primeira e segunda época de amostragem foram conservadas a 4°C, em caixas de isopor durante o transporte, e armazenamento no laboratório de Microbiologia do Solo,

na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), da Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba, SP, em câmara fria (4°C) durante todo o processamento. A partir das amostras de solo coletadas, foram retiradas alíquotas para avaliação de atributos químicos, microbiológicos e estrutura de comunidades de *Bacteria* e *Archaea* (1ª coleta), além da diversidade e estrutura de comunidades com base no perfil de PLFAs e Biolog, das áreas estudadas (2ª coleta). Para realização de todas as análises, as amostras provenientes dos três pontos coletados foram homogeneizadas, formando amostras compostas, totalizando 10 repetições em cada área. As amostras para as análises de extração do DNA foram armazenadas a -80°C, e para as análises microbiológicas, PLFA e Biolog a 4°C.

2.2.5 Avaliação dos atributos químicos

As amostras compostas foram secas em estufa a 60°C, moídas em moedor de solo e peneiradas em peneira com malha de 2 mm, sendo então enviadas ao Laboratório de Fertilidade e Física do Solo da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo. A caracterização química do solo obedeceu à metodologia proposta por Raij et al. (2001). A acidez ativa do solo foi determinada através da medição do pH em solução de 5 mL de solução 0,01 M de CaCl₂, na relação gravimétrica solo:água de 1:1. A determinação da matéria orgânica do solo (MOS) foi dada por digestão ácida dicromato/sulfúrico e mensurada fotometricamente, utilizando para o cálculo do carbono orgânico total (COT) o fator de Van Bemmelen (1,72). O fósforo, potássio, cálcio e magnésio foram extraídos da superfície de troca do solo por resina trocadora de íons. O fósforo foi quantificado colorimetricamente usando amônio/molibdênio. O cálcio e magnésio foram quantificados por espectrofotometria de absorção atômica, e o potássio por fotometria de chamas.

2.2.6 Avaliação dos atributos microbiológicos

Para determinação do carbono da biomassa microbiana (CBM) das amostras de solo foi utilizado o método de fumigação-extração (VANCE; BROOKS; JENKINSON, 1987). Para cada ponto amostrado foram realizadas duas repetições laboratoriais. Após a fumigação com clorofórmio livre de etanol (CHCl₃), o CBM foi extraído com sulfato de potássio 0,5 mol L⁻¹

(K₂SO₄) e oxidado com dicromato de potássio 66,7 mmol L⁻¹ (K₂Cr₂O₇). O teor de C solúvel foi determinado por titulação com Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O 33,3 mmol L⁻¹, na presença do indicador difenilamina (1%). O CBM foi calculado multiplicando a diferença entre carbono extraído do solo fumigado e não-fumigado pelo fator 2,64 (VANCE; BROOKS; JENKINSON, 1987).

A atividade microbiana foi determinada através da respiração basal das amostras de solo (C-CO₂) em amostras de 50 g de solo incubadas por 10 dias, a 28°C. O CO₂ liberado foi capturado em solução de NaOH 50 mmol L⁻¹ M, precipitado com solução de BaCl₂·2H₂O 0,5 mol L⁻¹, e quantificado por titulação o NaOH remanescente com HCl 50 mmol L⁻¹ na presença de fenolftaleína (ALEF; NANNIPIERI, 1995). A partir dos resultados de CBM e COT foi calculada a relação CBM:COT, expressa como a percentagem de C microbiano em relação ao C total do solo (ANDERSON, 1994). Com os resultados de atividade respiratória basal e do CBM calculou-se o quociente metabólico (*q*CO₂), que representa a taxa de liberação de C-CO₂ por unidade de C na biomassa microbiana.

2.2.7 Análises da estrutura das comunidades de *Bacteria* e *Archaea* por DGGE

2.2.7.1 Extração do DNA total do solo

A extração do DNA total do solo foi realizada a partir das amostras compostas de solos previamente homogeneizadas e armazenadas a -80 °C. Para extração do DNA total, foi utilizado o protocolo de extração do kit FastDNA[®] Spin for Soil (Q-Biogene). Em microtubos contendo granada finamente moída foi adicionado 0,5 g de solo, 978 µL de tampão fosfato e 122 µL de tampão MT. Os tubos foram agitados horizontalmente por 30 segundos a uma velocidade de 4 m s⁻¹ em um agitador FP120 Fast Prep Cell Disruptor (Q-Biogene). Em seguida, os microtubos foram centrifugados a 13.000 g por 1 minuto, transferindo-se o sobrenadante para um microtubo limpo de 1,5 mL. Ao sobrenadante adicionou-se 250 µL de tampão PPS, seguido de homogeneização por inversão por 10 vezes, e centrifugação a 13.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubos de polipropileno de fundo côncavo de 15 mL adicionando-se 1 mL de uma suspensão de matriz de ligação. Os tubos foram agitados em agitador horizontal em velocidade baixa por 2 minutos, e então, incubados por 3 minutos a

temperatura ambiente. A matriz de ligação foi transferida para um filtro acoplado a um microtubo de 1,5 mL (Spin Filter, Q-Biogene) e os tubos centrifugados a temperatura ambiente por 2 minutos a 13.000 g. A matriz de ligação retida no filtro foi lavada com 500 µL de uma solução de lavagem (SEWS), e o filtro centrifugado 2 vezes por 2 minutos a 13.000 g. Após incubação por 5 minutos à temperatura ambiente, foi adicionada 100 µL de água ultrapura ao filtro, centrifugando-se por 2 minutos a 13.000 g.

Devido à presença de elevado conteúdo de ácidos húmicos e outras impurezas detectadas via espectrofotometria a 260 nm, o DNA total de algumas amostras foi purificado por filtração em colunas SEPHADEX G-50 equilibradas com TE (pH 7.6), e autoclavadas por 15 minutos, segundo metodologia descrita em Sambrook; Fritsch e Maniatis (1989).

A solução de DNA total do solo obtida foi armazenada a -20°C. O DNA extraído foi posteriormente quantificado utilizando-se como padrão de tamanho e quantidade o marcador de massa Low DNA Mass Ladder (Invitrogen), através de densitometria, após eletroforese em gel de agarose 1% - TBE 0,5X (TBE 1X: 44mM Tris-borato, 1mM EDTA pH 8,0), utilizando-se de um densitômetro a laser FluorImager (GE Healthcare) e o programa Fragment Analysis (GE Healthcare).

2.2.7.2 PCR

A partir do DNA do solo, fragmentos da região V3 do gene rRNA 16S de microrganismos do domínio *Bacteria*, foram amplificados utilizando-se os iniciadores: BA338fGC (5'GCC CGC CGC GCG CGG CGG GCG GGG CGG GGG CAC GGA CTC CTA CGG GAG GCA GCA G 3') e UN518r (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3') (ØVREÅS et al., 1997).

As amplificações foram realizadas nas seguintes condições: 2,5 µL de tampão para PCR 10X; 0,2 mM de dNTP; 3,0 mM de MgCl₂; 1 unidade de Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen); 1 µL da amostra de DNA; 5 pmol de cada iniciador e água ultrapura estéril para um volume final de 25 µL. A amplificação foi realizada em um termociclador Mastercycler Gradiente (Eppendorf) utilizando-se na desnaturação: 95°C por 5 minutos; 30 ciclos de 92°C por 1 minuto; 55°C por 1 minuto; 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos. Os *amplicons* resultantes foram quantificados por densitometria após eletroforese em gel de agarose 1% (TBE 0,5X – gel e tampão de corrida), utilizando-se de um densitômetro laser FluorImager

(GE Healthcare) e o programa Fragment Analysis (GE Healthcare). O marcador de massa Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) foi utilizado como padrão de tamanho e quantidade de DNA.

Para amplificação de fragmentos do gene rRNA 16S de *Archaea* foram utilizados os iniciadores: ARCH21f (5' TTC YGG TTG ATC CYG CCI GA 3') e ARCH958r (5' YCC GGC GTT GA(I/C) TCC AAT T 3') (MOYER et al., 1998). Os *amplicons* resultantes da primeira amplificação foram utilizados como molde para uma nova amplificação com o seguinte conjunto de iniciadores: ARCH340fGC(5' CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC CTA CGG GGY GCA SCA G 3') e ARCH519r (5' TTA CCG CGG CKG CTG 3') (ØVREAS et al., 1997).

As amplificações foram feitas conforme descrito para *Bacteria*, e realizada em um termociclador Mastercycler Gradiente (Eppendorf), nas seguintes condições: 95°C por 5 minutos; 30 ciclos de 95°C por 30 segundos; 53°C por 30 segundos; 72°C por 1 minuto e 72°C por 6 minutos. Os *amplicons* resultantes foram quantificados por densitometria após eletroforese em gel de agarose conforme descrito anteriormente. Os *amplicons* do gene rRNA 16S de *Bacteria* e *Archaea* foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE).

2.2.7.3 DGGE

Para separação dos *amplicons* do gene rRNA 16S foi utilizada a eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE). Os géis de acrilamida:bisacrilamida (37,5:1, m:m) 8%, foram preparados com gradiente desnaturante variando de 15 a 55%, utilizando-se uma solução desnaturante 100%, contendo 7M de uréia e 40% formamida e uma solução 0%, sem uréia e formamida (ØVREAS et al., 1997). A eletroforese foi realizada a 200V e 60°C constantes, por 3 horas, em um sistema de eletroforese vertical DCode (BioRad), utilizando solução tampão de TAE 0,5X (10 mM Tris-acetato e 0,5 mM EDTA, pH 8,0). Após a eletroforese, o gel foi imerso em uma solução de 10% de ácido acético glacial por 15 minutos em agitador horizontal. Em seguida, o gel foi lavado três vezes com água destilada, imerso em solução de metanol 50% por 15 minutos, lavado três vezes com água destilada e imerso em solução de SYBR-Green I (Molecular Probes) (1:10.000, v:v) durante 30 minutos, em agitador horizontal, no escuro. Após a

coloração, a imagem do gel foi capturada utilizando-se um densitômetro a laser FluorImager (GE Healthcare) e o programa Fragment Analysis (GE Healthcare).

2.2.8 Análise de comunidades de *Bacteria* através do seqüenciamento de clones do gene rRNA 16S

2.2.8.1 Seleção das amostras

Para a construção das bibliotecas de clones da região V1-V3 do rDNA 16S de *Bacteria*, foram selecionadas amostras de cada área que apresentaram maior riqueza de *amplicons*, determinada com base no número de bandas com diferentes valores de migração relativa (Rf), detectadas após DGGE. Foram construídas três bibliotecas de clones do gene rRNA 16S de *Bacteria*, uma de cada amostra representativa das três áreas. O DNA total das amostras de solo selecionadas foi extraído utilizando-se o kit FastDNA[®] Spin for Soil (Q-Biogene), conforme descrito no item 2.2.7.1.

2.2.8.2 Amplificação de fragmentos do gene rRNA 16S

Para amplificação da região V1-V3 do gene rRNA 16S de *Bacteria* foram utilizados os seguintes iniciadores: PRBA63f (5' GGA TCC CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC 3') (MARCHESI et al., 1998) e UN518r (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3') (ØVREÅS et al., 1997). A amplificação foi realizada conforme descrito no item 2.2.7.2.

2.2.8.3 Purificação dos *amplicons*

Os *amplicons* resultantes da amplificação por PCR foram analisados em eletroforese em gel de agarose 1% (TBE 0,5X) e visualizados por coloração com SYBR-Green I (Molecular Probes). *Amplicons* foram purificados com o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante.

As bandas de DNA foram excisadas do gel de agarose e colocadas em microtubo de 1,5 mL, adicionando-se 1 µL mg⁻¹ de peso do gel de uma solução tampão de captura (GE

Healthcare). O microtubo foi agitado vigorosamente em vortex e incubado a 60°C até que a agarose estivesse completamente dissolvida. Após a dissolução total da agarose, a amostra foi centrifugada por 30 segundos a 12.000 g e incubada a temperatura ambiente durante 10 minutos. Cerca de 300 µL da amostra foi transferido para a coluna de purificação (GE Healthcare), incubada durante 10 minutos a temperatura ambiente, e centrifugada por 30 segundos a 12.000 g. Este processo foi então repetido com o volume restante da amostra. O líquido que passou pela coluna durante a centrifugação foi descartado e adicionou-se à coluna 500 µL do tampão de lavagem (GE Healthcare), seguido de uma incubação durante 10 minutos a temperatura ambiente, e centrifugação por 30 segundos a 12.000 g. A coluna foi então transferida para um microtubo de 1,5 mL. Para eluição do DNA adicionou-se 50 µL de TE pH 8,0 diretamente na matriz da coluna, incubando-se por 10 minutos, e em seguida centrifugou-se por 30 segundos a 8.000 g. O DNA recuperado no microtubo é novamente centrifugado por 90 segundos a 8.000 g, para remover a resina remanescente. A solução de DNA foi então transferida para novo microtubo de 1,5 mL. A qualidade do DNA foi determinada após eletroforese em gel de agarose 1% - TBE 0,5X e coloração com SYBR-Green I (Molecular Probes). O marcador de massa Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) foi utilizado como padrão de tamanho e quantidade de DNA.

2.2.8.4 Clonagem dos *amplicons* do gene rRNA 16S

Os *amplicons* do gene rRNA 16S purificados foram clonados no vetor pGEM-T Easy Vector (Promega), segundo as instruções do fabricante. A reação de ligação dos *amplicons* ao plasmídeo pGEM-TEasy foi feita utilizando-se tampão de ligação rápida 1X (30 mM de Tris-HCl pH 7.8, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de DTT, 1 mM de ATP e 5% de polietileno glicol) e 3 U de T4 DNA ligase. A solução foi incubada a 4°C durante toda a noite. No dia seguinte, células competentes de *E. coli* DH5α foram transformadas por choque térmico utilizando-se o produto da reação de ligação descrita. As células transformadas foram plaqueadas em meio Luria-Bertani (LB) - ágar contendo ampicilina (40 µg mL⁻¹) e X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactoside; 20 µg mL⁻¹), e colônias contendo o plasmídeo recombinante selecionadas. As bactérias contendo o plasmídeo recombinante foram cultivadas em 1 mL de meio Circlegrow

(CG) líquido contendo ampicilina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) a 38°C , sob agitação horizontal a 300 rpm (INOVA 4300), durante 22 horas.

2.2.8.5 Extração do DNA plasmidial

Após o cultivo das bactérias contendo o plasmídeo recombinante em microplacas, as suspensões celulares foram centrifugadas por 6 minutos a 4.000 g, a 20°C . O sobrenadante foi descartado, e o pélete obtido foi lavado com 240 μL de uma solução tampão contendo 25 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA (pH 8,0) e 50 mM de glicose, centrifugado a 20°C por 6 minutos a 4.000 g. Após descarte do sobrenadante, foi adicionado 80 μL da solução tampão, e em seguida, as células foram ressuspensas por agitação. Para uma microplaca de fundo U contendo 1 μL de RNase em cada cavidade (10 mg mL^{-1}) foram transferidos 60 μL de cada suspensão de células. Em cada poço da placa foram adicionados 60 μL da solução de lise (NaOH 0,2 N e SDS 1%), a placa foi selada, a suspensão homogeneizada por inversão e incubada à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 60 μL de solução contendo 3M de acetato de potássio, 10% de ácido acético glacial, misturando por inversão. A placa foi mantida por 10 minutos a temperatura ambiente, e então incubada aberta em estufa a 90°C por 30 minutos. Após esse tempo a placa foi resfriada em gelo por 10 minutos e centrifugada por 4 minutos (4.000 g, 20°C). O sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços Millipore (MAGV N22), fixada sobre uma placa de fundo “V” de 250 μL , e o conjunto centrifugado (sem a tampa) por 4 minutos a 4000 g a 4°C . Ao filtrado adicionou-se 110 μL de isopropanol gelado e em seguida centrifugou-se por 45 minutos a 4000 g a 4°C . O precipitado de DNA foi então lavado com 180 μL de etanol 70%. Centrifugou-se novamente a 4.000 g por 5 min a 4°C . Após o descarte do sobrenadante, inverteu-se a placa sobre papel absorvente e centrifugou-se por 1 minuto a 900 g a 4°C . Após secar durante 1 hora a temperatura ambiente, o DNA foi resolubilizado em 80 μL de água ultrapura estéril, durante toda a noite, e armazenado a -20°C . O DNA foi quantificado através de espectrofotometria a 260 nm, e sua integridade determinada por eletroforese em gel de agarose 1% - TBE 0,5X.

2.2.8.6 Seqüenciamento dos clones do gene rRNA 16S

Para o seqüenciamento dos clones do gene rRNA 16S utilizou-se 200-500 ng de DNA plasmidial, 10 pmol do iniciador M13f, 2 µL de *DYEmanic ET Terminator* (GE Healthcare), 2 µL de solução tampão Save Money (200 mM Tris-HCl pH 9,0 e 5 mM MgCl₂.6H₂O) e água ultrapura para um volume final de 10 µL. A amplificação por PCR foi realizada em um termociclador Mastercycler Gradiente (Eppendorf), com as seguintes condições: 25 ciclos de 20 segundos a 95°C, 15 segundos a 50°C e 1 minuto a 60°C. Os produtos da PCR foram precipitados com 1/10 de volume de uma solução de acetato de sódio 1,5 M e EDTA 250 mM e 6 volumes de etanol 95% gelado. As suspensões foram centrifugadas a 4.000 g por 45 minutos, e o pélete lavado com etanol 70%, a temperatura ambiente. O pélete foi seco no escuro por no mínimo 2 horas, ressuspendido em formamida e desnaturado a 96 °C por 5 minutos. O seqüenciamento foi realizado em um seqüenciador capilar automático ABI 3100 (Applied Biosystems), de acordo com as recomendações do fabricante.

2.2.9 Capacidade de utilização de substratos de carbono (Biolog)

A estrutura das comunidades microbianas com base na capacidade de utilização de fontes de C foi avaliada utilizando o Biolog Ecoplates® (Biolog Inc., CA, USA). Cada microplaca Biolog contém 31 fontes de carbono amplamente utilizadas por microrganismos do solo e similares às fontes de C encontradas normalmente nos solos (Tabela 1), em triplicata, e uma cavidade sem nenhuma fonte de carbono (controle negativo com água), além do corante indicador tetrazólio violeta. As microplacas Biolog foram inoculadas com suspensões de solo, preparadas com 2 gramas de solo e 38 mL de uma solução de pirofosfato (0,2%). Uma solução de ciclohexamida (6 mL; 1%) foi adicionada para prevenir o crescimento fúngico. Essas suspensões foram, então, dispersas por 1 hora em agitador orbital (Tecnal TE-420) e decantadas para remoção de partículas grosseiras. Diluições seriadas foram realizadas e cada cavidade das microplacas Biolog foram inoculadas com 140 µL de suspensão de solo, contendo 10³ a 10⁴ células por mL. Esta concentração do inóculo foi determinada através de diluições seriadas e contagem em placa contendo o meio de cultivo R2A (GARLAND, 1997), incubado pelo período de 48 horas a 24°C. O processo de oxidação foi monitorado duas vezes ao dia durante 10 dias,

medindo a formação da coloração pelo aumento da absorbância, determinado por espectrofotometria a 590 nm, utilizando-se um leitor de microplaca (Tecan Sunrise). Durante este período as placas foram incubadas no escuro a 22°C (CALHÔA, 2003).

Tabela 1 – Fontes de carbono contidas nas microplacas Biolog Ecoplates®. Categorização dos substratos de carbono sugerida por Dobranic e Zak (1999)

Categoria	Nome da fonte de carbono
Polímero	Glicogênio
	Tween 40
	Tween 80
Carboidrato	α -Ciclodextrina
	D-Celobiose
	i-Eritritol
	α -D-Lactose
	β -Metil-D-Glicosídeo
	D-Xilose
	D-Manitol
Ácido Carboxílico	N-Acetil-D-glicosamina
	Ácido D-Galacturônico γ -Lactona
	Ácido γ -Hidroxi-butírico
	Ácido Itacônico
	Ácido α -Cetobutírico
	Ácido-D-Glicosamínico
	Ácido D-Galacturônico
	Ácido D-Málico
	Ácido 2-Hidroxi-benzóico
	Ácido 4-Hidroxi-benzóico
Aminoácido	L-Serina
	L-Arginina
	L-Asparagina
	L-Fenilalanina
	L-Treonina
	Ácido Glicil-L-glutâmico
Amina/Amida	Feniletlanina
	Putrescina
Miscelânea	D,L- α -Glicerol fosfato
	Glicose-1-fosfato
	Éster Metílico do Ácido Pirúvico

2.2.10 Perfis de ácidos graxos ligados a ésteres de fosfolipídios (PLFAs)

Para extração dos lipídeos totais do solo foi utilizado o método Bligh e Dyer (1959), com modificações. Os lipídeos do solo foram extraídos com uma mistura de fases. Foram utilizados tubos de 50 mL com tampa de teflon, os quais foram lavados com uma mistura de solventes

orgânicos 1:1 (clorofórmio e metanol). As células microbianas do solo foram extraídas (6 ± 0.2 g de peso fresco ou aproximadamente 3.3 ± 0.6 g de peso seco) com 3 mL de uma solução de pirofosfato 0.1%, agitadas durante 1 hora e centrifugadas por 15 minutos para remoção do sobrenadante. O pélete (célula + argila) foi extraído com 10 mL da solução Bligh e Dyer (B&D) (clorofórmio:metanol:fosfato de potássio 50 mmol L^{-1} pH 7,4, 1:2:0.8 v/v/v). A mistura foi homogeneizada por 15 segundos em vortex, e extraída por 4 horas a temperatura ambiente. Após agitação, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 3.000 g. O sobrenadante foi transferido a um novo tubo. O pélete remanescente foi re-extraído durante 1 hora utilizando-se de 5 mL da solução B&D. O sobrenadante foi adicionado ao tubo contendo a alíquota da primeira extração. Os lipídios foram então extraídos pela adição de 4 mL de clorofórmio e 4 mL de tampão fosfato, homogeneizados por 1 minuto em vortex com separação das fases. A fase CHCl_3 foi coletada (fase superior) e transferida com auxílio de pipetas de Pasteur a um novo tubo, tendo o seu volume reduzido por evaporação rotatória a 40°C . Após adição de $50 \mu\text{L}$ do ácido graxo saturado 19:0 ($0,023 \text{ mg mL}^{-1}$) como padrão interno, sob um fluxo de nitrogênio livre de oxigênio (N_2). O resíduo foi submetido à metalanose alcalina pela adição de uma mistura (1 mL) de KOH 0.2 M em metanol e tolueno:metanol (1:1 v/v), agitação vigorosa por 5 segundos, seguido por incubação a 37°C por 15 minutos. Após resfriamento, as misturas foram neutralizadas com 0,3 mL de ácido acético 1M e 2 mL de água, e os ácidos graxos ligados a ésteres de fosfolipídios (PLFAs) foram extraídos duas vezes com 2 mL de clorofórmio:hexano (4:1, v/v). Após evaporação do solvente sob um fluxo de nitrogênio livre de oxigênio (N_2), os PLFAs foram ressuspendidos em clorofórmio:hexano (4:1, v/v) contendo o padrão interno. Os PLFAs foram separados por cromatografia gasosa, utilizando um cromatógrafo a gás Hewlett-Packard modelo 6890N (Agilent Technologies, Palo Alto, CA), um injetor HP 7683B SERIES (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) com detector de ionização de chama. Foi usada uma coluna capilar de silicone fundida de 25 m, com diâmetro interno de 0,2 mm e espessura do filme de $0,20 \mu\text{m}$. A cromatografia foi feita utilizando-se hidrogênio como gás de arraste a uma taxa de fluxo constante de 5 mL min^{-1} , pressão de 60 kPa, razão de divisão das amostras de 1:55, e temperatura do ponto de injeção de 300°C . A temperatura do forno foi programada para um gradiente de 170 a 270°C a 5°C min^{-1} . Os PLFAs foram identificados e quantificados por comparação do tempo de retenção com padrões conhecidos usando o software MIS Library Generation (Microbial ID Inc., Newark, Del.) e confirmado por espectrometria de massas.

A nomenclatura de ácidos graxos utilizada é na forma de $A:B\omega C$, onde 'A' é o número de átomos de carbono na cadeia, 'B' é o número de duplas ligações, e 'C' é a posição da dupla ligação da extremidade metil da molécula, geometria cis é indicada pelo sufixo 'c'. Os prefixos 'i', 'a' e 'me' referem-se a iso, anteiso e ramificação metil média, respectivamente, com 'cy' indicando a estrutura do anel ciclopropil.

2.2.11 Análise dos dados

2.2.11.1 Análise estatística de dados químicos e microbiológicos

Os dados químicos e microbiológicos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando-se o programa estatístico SAS versão 8.2 (SAS Institute Inc., 2002) e as médias comparadas pelo teste LSD ($P < 0,05$). No entanto, com o objetivo de melhor separar ou discriminar as áreas estudadas (FN, RF e RQ), dando medidas quantitativas aos atributos estudados, foi utilizada a análise multivariada dos dados, através da análise canônica discriminante (ACD). Desta maneira procurou-se identificar preliminarmente os atributos químicos e microbiológicos que mais contribuíram para separação entre as áreas estudadas. Os dados químicos e microbiológicos foram submetidos à análise multivariada por meio da ACD, através do programa estatístico SAS versão 8.2 (SAS Institute Inc., 2002). Quando verificada diferença significativa entre as áreas estudadas, através da ACD, foi realizado teste de comparação de médias nos valores dos coeficientes canônicos padronizados (CCP), nas distintas funções canônicas, por meio do teste de LSD ($P < 0,05$), conforme Cruz-Castillo et al. (1994).

2.2.11.2 Análise da diversidade genética

A similaridade entre as estruturas de comunidades de *Bacteria* e *Archaea* foi determinada com base na presença ou ausência das bandas detectadas no gel após DGGE com a utilização do programa Diversity Database (BioRad). A análise de agrupamento hierárquico foi feita com o programa Systat 8.0, utilizando-se matrizes de similaridade geradas pelo método de concordância simples (*simple matching*), algoritmo de Ward e a distância Euclidiana como unidade de medida.

Foram ainda empregadas técnicas multivariadas para o estudo das comunidades de *Bacteria* e *Archaea* nas florestas estudadas através do programa estatístico CANOCO versão 4.0 (TER BRAAK; SMILAUER, 1998). Com o objetivo de verificar a associação da variabilidade dos perfis de bandeamento do gene rRNA 16S de *Bacteria* e *Archaea* após DGGE aos atributos químicos e microbiológicos mensurados nas três áreas, procedeu-se uma análise de escala multidimensional (Non-metric Multidimensional Scaling - NMDS). O princípio da análise passa por aproveitar os valores de similaridade entre as amostras para o cálculo de coordenadas num espaço de ordenação utilizando-se o programa WinKyst e o coeficiente de similaridade de Jaccard. O resultado desta análise (cálculo das coordenadas) é utilizado posteriormente em uma análise indireta como a análise de componentes principais (ACP) através do programa CANOCO versão 4.6 (TER BRAAK; SMILAUER, 1998), tendo como variáveis explicativas a matriz de dados ambientais (atributos químicos e microbiológicos) e a matriz de ausência/presença de bandas (dados binários) como variáveis ambientais suplementares.

A ordenação baseada na similaridade entre as amostras foi obtida pela análise NMDS através do programa PRIMER 5 (PRIMER-E Ltda, 2001). Subseqüentemente uma análise de similaridade (ANOSIM) foi realizada para determinar diferenças estatísticas entre as áreas estudadas utilizando o mesmo programa.

2.2.11.3 Análises das seqüências do gene rRNA 16S

As seqüências de nucleotídeos geradas pelo seqüenciamento dos clones do gene rRNA 16S de *Bacteria* foram analisadas através do programa Phred/Phrap (EWING; GREEN, 1998) para remoção de seqüências do vetor e bases de baixa qualidade. Foram aceitas apenas as seqüências que apresentaram pelo menos 300 bases com qualidade > 20, representando menos de um erro a cada 100 bases lidas.

Para a afiliação filogenética das seqüências de nucleotídeos dos clones do gene rRNA 16S utilizou-se o programa RDPquery versão 9.52 (2006), o qual compara cada seqüência do gene rRNA 16S com as seqüências depositadas no Ribosomal Database Project (RDP), e baseado na distância evolutiva calculada entre as seqüências que serão classificadas e aquelas de maior similaridade no banco de dados, define a possível afiliação em diferentes níveis taxonômicos.

Para o agrupamento das seqüências de nucleotídeos em unidades taxonômicas operacionais (UTOs) foi utilizado o programa DOTUR (*Distance Based OTU and Richness Determination*) (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005). Para tanto, as seqüências foram alinhadas utilizando-se o programa Clustal X 1.83 (THOMPSON et al., 1997) com os parâmetros *gap-opening penalty* de 10.0 e *gap-extention penalty* de 0.1 para *pairwise* e *multiple alignment*, com demais definições de parâmetros padrões. O alinhamento foi utilizado para cálculo de uma matriz de distância evolutiva utilizando-se o programa DNADIST, do pacote PHYLIP 3.63 (FELSESTEIN, 1993), usando o algoritmo de Jukes-Cantor para correção das distâncias.

Os números de UTOs e de seqüências de cada UTO foram computados para o cálculo dos índices de diversidade de Shannon e recíproco de Simpson, e para a estimativa de riqueza de espécies pelos métodos não-paramétricos ACE e Chao1 (CHAO, 1987; CHAO; LEE, 1992), além da estimativa da cobertura de amostragem com o programa SPADE.

A comparação entre as bibliotecas de clones do gene rRNA 16S foi feita utilizando-se o programa S-LIBSHUFF (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005), o qual determina o nível de probabilidade de duas bibliotecas serem diferentes entre si, com base em curvas de coberturas homólogas e heterólogas, após o alinhamento das seqüências e cálculo das matrizes de distâncias evolutivas conforme descrito acima. Uma análise multivariada foi realizada utilizando-se o número de UTOs estimado pelo DOTUR para as bibliotecas de cada área através do programa CANOCO versão 4.6 (TER BRAAK; SMILAUER, 1998). O número de UTOs foi utilizado para obtenção do comprimento do gradiente, e seleção do modelo de resposta a ser utilizado pelo programa. Como este gradiente foi maior que três (resposta unimodal), optou-se pela a utilização da Análise de Correspondência (AC).

2.2.11.4 Análise estatística da capacidade de utilização de substratos de carbono (Biolog)

Os valores de absorvância obtidos com o sistema Biolog Ecoplates® (Biolog Inc., CA, USA) foram corrigidos para a absorvância no tempo zero, e após, cada valor de absorvância em cada cavidade da placa foi subtraído a absorvância do controle sem carbono. Este valor foi então utilizado para o cálculo do índice médio de desenvolvimento da cor (AWCD), de acordo com Ibekwe e Kennedy (1998).

Após a correção de cada substrato a taxa de utilização de substratos da comunidade foi analisada estimando parâmetros cinéticos pelo ajuste da curva de absorbância a 590 nm em relação ao tempo de incubação, utilizando-se um modelo de crescimento logístico (LINDSTRÖM; BARRY; BRADDOCK, 1998):

$$DO_{590} = K / (1 + e^{-R(T-S)}), \quad (1)$$

onde, K representa a assíntota ou máximo grau de desenvolvimento da cor (A_{590}), R determina a taxa exponencial de mudança de A_{590} (h^{-1}), T é o tempo seguinte à inoculação (h) e S é o tempo para alcançar o ponto central da fase exponencial da curva, quando $K/2$ (h).

O ajuste do modelo cinético e a estimativa dos parâmetros foi realizada utilizando-se o programa SAS versão 8.2 (SAS Institute Inc., 2002), com o algoritmo de Gauss-Newton. Parâmetros da curva com erro padrão maior que o valor do parâmetro estimado foram evidenciados como um mal ajuste e os dados cinéticos para este substrato não foram utilizados. Cerca de 10% das curvas geradas para as amostras ambientais (93 de 930) foram excluídas da análise estatística posterior.

Os parâmetros cinéticos provem informações de diferentes aspectos de utilização das fontes de carbono: a assíntota (K) é um estimador da quantidade potencial máxima de substrato utilizado, a taxa exponencial (R) é um parâmetro que fornece informações do quão rapidamente a fonte de carbono é metabolizada pela comunidade, e o tempo para alcançar o ponto central (S) fornece informações sobre a densidade de inóculo inicial e a relativa taxa de crescimento das espécies hábeis a utilizar as fontes de carbono de cada poço (LINDSTRÖM; BARRY; BRADDOCK, 1998; PRESTON-MAFHAM; BODDY; RANDERSON, 2002).

Para eliminar a influência da densidade do inóculo na análise cinética, uma vez que o incremento na densidade provoca diminuição da fase lag, incrementando o declive e o integral desenvolvimento da cor; a densidade do inóculo foi previamente padronizada quando da inoculação das microplacas como descrito anteriormente em materiais e métodos (item 2.2.9), e os dados foram normalizados anteriormente a análise estatística pela divisão dos parâmetros cinéticos para cada poço individual pelo valor médio do respectivo parâmetro para a placa inteira (GARLAND, 1997).

Para obter informações sobre os padrões de utilização das fontes de carbono, os substratos foram nomeados dentro de seis grupos de acordo com sua natureza química (ZAK et al., 1994): aminas, aminoácidos, carboidratos, ácido carboxílico, miscelânea e polímeros. Os parâmetros cinéticos para cada substrato foram estimados e divididos pelo valor médio da placa (normalização). Depois, os parâmetros cinéticos para cada grupo foram calculados com a média dos parâmetros cinéticos individuais normalizados e foram usados para comparar a comunidade microbiana das diferentes áreas de florestas.

Foram ainda calculados o índice de diversidade de Shannon (H), que compreende tanto a riqueza de substrato como a intensidade com que os substratos são usados pela microbiota, calculado de acordo com Zak et al. (1994), utilizando a seguinte equação:

$$H = - \sum p_i (\ln p_i), \quad (2)$$

onde, H representa o índice de diversidade de Shannon, p_i a razão entre a atividade de utilização do substrato e a atividade de utilização de todos os substratos.

A riqueza de substratos (S_s) foi determinada através do número total de substratos utilizados (AWCD) pela comunidade microbiana do solo. A equitabilidade de substratos (E), que mede a uniformidade de utilização de um substrato em relação ao número de substratos utilizados pela microbiota, foi calculada de acordo com a equação:

$$E = \frac{H}{\ln S_s}, \quad (3)$$

onde, E representa a equitabilidade, S_s é a riqueza de substrato, e o H é o índice de diversidade de Shannon.

Os índices de diversidade, parâmetros cinéticos estimados para AWCD e grupo de substratos das diferentes áreas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando-se o programa estatístico SAS versão 8.2 (SAS Institute Inc., 2002) e as médias comparadas pelo teste LSD ($P < 0,05$). Os parâmetros cinéticos estimados para o AWCD foram ainda correlacionados com parâmetros químicos através da análise de correlação de Pearson (ZAR, 1996) utilizando o programa estatístico SAS versão 8.2 (SAS Institute Inc., 2002).

Ordenação baseada na similaridade das amostras foi obtida pela análise de escala multidimensional (Non-metric Multidimensional Scaling - NMDS). Subseqüentemente, uma análise de similaridade (ANOSIM) foi realizada para determinar se havia diferenças estatísticas significativas entre as áreas estudadas. A matriz de similaridade foi obtida através da distância Euclidiana normalizada dos valores transformados dos parâmetros cinéticos ($\log(x+1)$). Adicionalmente, os grupos de substratos das diferentes áreas foram utilizados para verificar o comprimento do gradiente. Já que este comprimento foi menor que três (resposta linear), a análise de componentes principais foi escolhida (ACP), por meio do programa CANOCO versão 4.6 (TER BRAAK, 1986; TER BRAAK; SMILAUER, 1998). A análise NMDS e de similaridade (ANOSIM) foram executadas com o programa PRIMER 5 (PRIMER-E Ltda, 2001).

2.2.11.5 Análise estatística dos perfis de ácidos graxos ligados a ésteres de fosfolipídios (PLFAs)

Para cada amostra, a abundância relativa de cada ácido graxo ligado a ésteres de fosfolipídio (PLFA) foi determinada e usada para a análise NMDS. A análise permite representar graficamente em um conjunto de 2 dimensões, a dissimilaridade entre os diferentes pontos amostrados em cada área, baseada em sua composição de PLFAs. Subseqüentemente, uma análise de similaridade (ANOSIM) foi realizada para determinar diferenças estatísticas significativas entre as áreas estudadas. Ambas as análises foram realizadas utilizando o programa estatístico PRIMER 5 (PRIMER-E Ltda, 2001).

A análise foi realizada utilizando-se os PLFAs de maior freqüência. PLFAs presentes em apenas uma das dez réplicas de amostras de solo das áreas dentro de todo o conjunto de dados, foram retirados da análise (SCHUTTER; DICK, 2000). Do total de 26 ácidos graxos totais identificados apenas 13 foram utilizados para a análise. Os seguintes PLFAs foram deletados: 9:0, 10:0, 12:0, 17:0, 15:1 ω 6c, 16:1 ω 7c, 18:2 ω 6,9,12c, a13:0, i14:0, 21:1 3OH, a17:1 ω 9c, cy 17:0. Os dados foram transformados por $\log(x+1)$ para reduzir a não normalização do conjunto de dados. Foi utilizado como medida de distância Sorensen e 150 interações foram realizadas para minimizar o stresse. O estresse é uma medida de dissimilaridade entre a ordenação no espaço n dimensional original e o espaço dimensional reduzido.

PLFAs específicos representativos de: biomassa microbiana, biomassa fúngica, bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e índice de estresse nutricional foram agrupados. Para a composição do agrupamento foram somados os seguintes PLFAs biomarcadores: bactérias Gram-positivas (*i14:0*, *i15:0*, *a15:0*, *i16:0*, *i16:1 I*, *i17:0* e *a17:0*), bactérias Gram-negativas (*cy17:0*, *cy19:0*, 16:1 ω 7c álcool), fungos (18:1 ω 9c, 18:2 ω 6,9,12c e 18:3 ω 6,9,12c), bactérias totais (14:0, 16:0, 18:0, *i14:0*, *i15:0*, *a15:0*, *i16:0*, *i16:1 I*, *i17:0* e *a17:0*), biomarcadores para o estresse fisiológico (*cy17:0*, *cy19:0* e 16:1 ω 7c álcool) (BARDGETT; HOBBS; FROSTGÅRD, 1996; FROSTEGÅRD; BÅÁTH, 1996; IBEKWE; KENNEDY, 1998) (Tabela 2). Para acessar os efeitos específicos de cada área avaliada sobre os PLFAs uma análise de componentes principais (ACP) foi realizada utilizando o programa CANOCO versão 4.6 (TER BRAAK, 1986; TER BRAAK; SMILAUER, 1998).

Tabela 2 – Ácidos graxos ligados a ésteres de fosfolípidios (PLFAs) usados como bioindicadores. Fonte: Wilkinson et al., 2002

Marcadores	Marcadores para	Comentário	Referência
<i>i15:0</i> , <i>a15:0</i> , 15:0, <i>i16:0</i> , 16:1 ω 7trans, 16:1 ω 9, 17:0, <i>i17:0</i> , <i>a17:0</i> , <i>cy17:0</i> , 18:1 ω 7 e <i>cy19:0</i>	Bacteria	Originalmente desenvolvido para sedimentos, mais recentemente aplicado para liteira de florestas.	Frostegård e Bååth (1996).
18:2 ω 6 e 18:3 ω 6	Fungo	Boa a relação com concentrações de ergosterol.	White et al. (1996).
ω 7 monoinsaturado 16:1 ω 7, 18:1 ω 7	Gram-negativa	Geralmente considerado como bom biomarcador.	Borga et al. (1994), Zelles (1997), Steinberger et al. (1999).
Ciclopropil <i>cy17:0</i> , <i>cy19:0</i>	Gram-negativa	Bom bioindicador de Gram-negativas de acordo com a literatura, alguns organismo apresentam.	Zelles (1997).
Ramificado terminalmente <i>a15:00</i> , <i>i15:00</i> , <i>i16:0</i> , <i>i17:0</i> e <i>a17:0</i>	Gram-positiva (abundantes em algumas Gram-negativas)	Ramificado nas posições terminais. Considerado o melhor marcador para microrganismos.	White et al. (1996), Zelles (1997).
Polinsaturado 18:3, 20:4	Micro-eucariotos	Boa relação.	Zelles e Bai (1994), White et al. (1996)
Ciclopropil total/ ω 7monoinsaturado total	Estresse nutricional	Associados com transições de crescimento microbiano a fase de crescimento estacionário.	Reichardt et al. (1997).

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Atributos químicos do solo

Os atributos químicos: $\text{pH}_{\text{CaCl}_2}$, fósforo (P), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e saturação por bases (V) diferiram estatisticamente ($P < 0,05$) entre as áreas estudadas. Enquanto, o teor de H+Al, o potássio (K), o teor de matéria orgânica do solo (MOS) e a capacidade de troca de cátions (CTC) não apresentaram diferenças estatísticas significativas (Tabela 3). Na média das repetições, os maiores teores encontrados foram nas áreas de floresta nativa (FN) e reflorestamento com queima (RQ) (Tabela 3).

As áreas de floresta nativa (FN), reflorestamento (RF) e reflorestamento com queima (RQ) apresentaram solos extremamente ácidos (pH 3,7; 3,9 e 3,9; respectivamente), com elevado conteúdo de matéria orgânica (150,3; 136,7 e 157,7 g dm^{-3}), alto teor de H+Al (204,8; 170,7 e 192,7 $\text{mmol}_c \text{dm}^{-3}$) e baixa disponibilidade de cátions metálicos básicos (Ca, Mg, K); além, de baixa saturação por bases (V; 4,1; 2,7 e 3,2%) e elevada capacidade de troca de cátions (CTC) (213,4; 175,3 e 199,2 $\text{mmol}_c \text{dm}^{-3}$), havendo dentro das áreas amostradas grande variação entre os pontos amostrados (Tabela 3).

Tabela 3 – Caracterização química do solo, na camada de 0-20 cm de profundidade, em áreas de floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima (RQ), no PECJ

Atributos	FN	RF	RQ
pH (0,01 mol L^{-1} CaCl_2)	3,7 \pm 0,1 b ¹	3,9 \pm 0,1 a	3,9 \pm 0,1 a
H+Al ($\text{mmol}_c \text{dm}^{-3}$)	204,8 \pm 74,8 a	170,7 \pm 29,5 a	192,7 \pm 26,9 a
Fósforo (P) (mg dm^{-3})	9,9 \pm 3,6 a	3,7 \pm 0,8 b	8,9 \pm 1,9 a
Potássio (K) ($\text{mmol}_c \text{dm}^{-3}$)	3,2 \pm 1,3 a	2,2 \pm 0,7 a	2,9 \pm 1,0 a
Cálcio (Ca) ($\text{mmol}_c \text{dm}^{-3}$)	3,2 \pm 2,0 a	1,4 \pm 0,5 b	2,2 \pm 0,4 ab
Magnésio (Mg) ($\text{mmol}_c \text{dm}^{-3}$)	2,2 \pm 1,2 a	1,0 \pm 0,0 b	1,4 \pm 0,5 b
Matéria Orgânica (M.O.) (g dm^{-3})	150,3 \pm 75,7 a	136,7 \pm 27,0 a	157,7 \pm 21,2 a
CTC ($\text{mmol}_c \text{dm}^{-3}$)*	213,4 \pm 78,4 a	175,3 \pm 29,4 a	199,2 \pm 27,8 a
Saturação por Bases (V) (%)*	4,1 \pm 1,2 a	2,7 \pm 0,8 b	3,2 \pm 0,7 b

¹Valores são médias \pm desvio padrão ($n=10$). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste LSD ($P < 0,05$).

*Para o cálculo da análise canônica discriminante estes atributos foram eliminados devido ao efeito de colinearidade.

Os teores de Ca variaram de 1,2 a 5,2 $\text{mmol}_c \text{dm}^{-3}$ na FN, de 0,9 a 1,9 $\text{mmol}_c \text{dm}^{-3}$ no RF e, 1,8 a 2,6 $\text{mmol}_c \text{dm}^{-3}$ no RQ, com seus teores médios em torno de 3,2; 1,4 e 2,2 $\text{mmol}_c \text{dm}^{-3}$,

respectivamente; e para o Mg de 1,0 a 3,4 mmol_c dm⁻³ na FN, de 0,9 a 1,9 mmol_c dm⁻³ no RQ, com seus teores médios em torno de 2,2 e 1,4 mmol_c dm⁻³, respectivamente (Tabela 3). Para o RF não houve variabilidade entre as repetições (1,0 mmol_c dm⁻³). Os teores de P encontrados na profundidade de amostragem do solo foram suficiente (9,9 mg dm⁻³), baixo (3,7 mg dm⁻³) e médio (8,9 mg dm⁻³), respectivamente, para as áreas de FN, RF e RQ (Tabela 3). Para o nutriente em questão, a área de RF diferiu das áreas de FN e RQ, que foram estatisticamente iguais (Tabela 3).

Apesar de ocorrer em diversos tipos de solos, a *Araucaria angustifolia* tem se mostrado uma espécie exigente quanto à fertilidade do solo. Vários autores relatam correlações positivas entre o crescimento da araucária e atributos químicos do solo, tais como: pH, saturação por bases, conteúdo de nitrogênio total, P e B (GOLFARI; CASER; MOURA, 1978; LA BASTIDE; Van GOOR, 1970; Van GOOR, 1965), com maior dependência em relação aos níveis de N, seguido dos teores de P, Ca, Cu e B no solo (BLUM, 1980). Blum (1980) e Van Goor (1965) associaram a necessidade de boa disponibilidade de Ca e Mg como condição determinante para o bom desenvolvimento da espécie em solos ácidos.

Processos como a absorção de nutrientes pelas raízes das plantas, decomposição do material orgânico que se acumula nas camadas superficiais do solo, e até mesmo a fixação biológica do nitrogênio contribuem para o abaixamento do pH em solos florestais (MEURER, 2000; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). No entanto, a acidificação não provoca acentuada toxidez do alumínio para as espécies vegetais, devido, à complexação do mesmo por substâncias orgânicas formadas durante o processo de decomposição do material vegetal, diminuindo a atividade do alumínio na solução do solo (MEURER, 2000).

A vegetação da Floresta Ombrófila Mista, popular Mata de Pinheiro ou Araucária, não é uma formação homogênea e contínua, mas sim composta de formações vegetais com múltiplas associações e grupamentos entre espécies de plantas, que variam com os diferentes estádios de sucessão (KLEIN, 1960). Tal condição permite que o aporte de material orgânico depositado na superfície do solo (serapilheira) seja extremamente diverso, enriquecendo a qualidade do material orgânico do solo, além de contribuir para a diversificação dos compostos exsudados na rizosfera pelo sistema radicular das diferentes espécies.

De acordo com Fernandes e Backes (1998), nas florestas nativas com araucária na Floresta Nacional de São Francisco de Paula, RS, a contribuição da araucária para a formação de

serapilheira é maior que a do restante da vegetação, tanto com estruturas vegetativas como reprodutivas. Entretanto os períodos de maior queda de material são diferenciados; enquanto no verão e no outono a contribuição da araucária para a composição da serapilheira varia de 85-67%, no inverno e na primavera varia de 70-46%. De forma inversa, as latifoliadas contribuem com 33-15% para a formação da serapilheira durante o verão e o outono, e com 54-30% durante o inverno e primavera.

A deposição de serapilheira em povoamentos formados por espécies nativas, como a *Araucaria angustifolia*, é um dos aspectos primordiais a serem estudados na avaliação da nutrição mineral e ciclagem de nutrientes nessas florestas, pois representam a principal fonte de nutrientes para a espécie. Schumacher et al. (2004) verificaram, ao estudar a composição da serapilheira de Floresta de Araucária e sua contribuição para a nutrição mineral da espécie, que as acículas são as principais responsáveis pelo aporte de nutrientes no solo, sendo o Ca transferido em maior quantidade, seguido por N, K, Mg e P.

A importância da serapilheira na ciclagem de nutrientes em ecossistemas florestais varia de acordo com a composição vegetal. O monocultivo que normalmente caracteriza populações de reflorestamento proporciona um ambiente uniforme, modificando a diversidade de substrato para a biota do solo, conseqüentemente, diminuindo a oferta de nutrientes minerais para as plantas quando comparado a florestas nativas (BARETTA et al., 2003).

Da mesma maneira, o impacto do fogo nas florestas altera a disponibilidade de nutrientes para as plantas, além de alterar a composição da estrutura das comunidades microbianas do solo responsáveis pela ciclagem dos nutrientes. A queima acelera a mineralização da MO, liberando nutrientes para a solução do solo, deixando-os susceptíveis às perdas por lixiviação e volatilização (MROZ et al., 1980), além de eliminar a cobertura vegetal e facilitar as perdas por erosão laminar (BERTOL; COGO; LEVIEN, 1997; HERINGER; JACQUES, 2002).

Carballas et al. (1994), encontraram ao estudar o efeito dos incêndios florestais em solos ácidos de florestas no Mediterrâneo que dependendo da intensidade e do aquecimento do solo os incêndios podem provocar uma completa destruição da vegetação, com alterações na estrutura do solo, aumentando a disponibilidade de nutrientes e elevação do pH, bem como o decréscimo da disponibilidade de C e N. Brinkley et al. (1994), após acompanhar durante 30 anos a aplicação do fogo controlado em florestas de pinheiros na Carolina do Sul (EUA), conclui que apenas o fogo aplicado anualmente causa prejuízos a integridade química do solo.

Provavelmente o fogo, na área de RQ, serviu para acelerar a disponibilidade dos nutrientes através do aumento da taxa de mineralização do material orgânico, mas muito pouco provável seja responsável pela caracterização química do solo desta área. Isso porque, parte dos nutrientes disponibilizados quando da queima, provavelmente, já tenham sido lixiviados. Durante a queima, a biomassa florestal e a MOS sofrem abrupta mineralização, principalmente nos primeiros centímetros de solo, devido às cinzas de alta concentração de P, K e Ca (COUTINHO, 1990; OWENSBY; WYRILL, 1973). No entanto, durante períodos de chuvas intensas, elementos como o Ca, Mg, K e N são arrastados pelas águas, sendo lixiviados em profundidade, o que prejudica a reciclagem destes nutrientes em sistemas florestais (JORDAN, 1987).

Talvez o principal efeito do fogo na área RQ, tenha sido a promoção da alteração das comunidades microbianas do solo e seus efeitos nos processos de ciclagem de nutrientes (BÉLENGER et al., 2004), além de acelerar a germinação de algumas espécies vegetais nativas, auxiliando para recomposição vegetal da área, e enriquecimento de sua liteira (NETTO; SANQUETTA; BRENA, 2006). França e Poggiani (1996) observaram em áreas de sucessão secundária na Floresta Nacional do Jamari, RO, que em locais afetados pelo fogo ocorre uma maior penetração de radiação solar e conseqüentemente, elevação da temperatura do solo, sendo tais condições climáticas suficientes para promoção da germinação e o desenvolvimento de espécies arbóreas secundárias, favorecendo a disseminação de gramíneas invasoras e outras espécies vegetais.

A recomposição vegetal de uma área, assim como a riqueza de espécies vegetais pode estar associada à qualidade do material orgânico encontrado no solo. A definição de qualidade da matéria orgânica é algo complexo e ainda não bem definida. Para sistemas florestais, a qualidade pode estar associada à capacidade da MOS em promover uma boa disponibilidade de nutrientes para a manutenção da sustentabilidade do sistema (LAL, 1999).

A variabilidade espacial é o atributo ambiental que está mais consistentemente ligado à quantidade de espécies, e consiste em uma mistura de materiais formadores, oriundos de diferentes espécies arbóreas (CORREIA; ANDRADE, 1999). A grande variação de espécies em sistemas florestais tropicais, por exemplo, dão origem a diferentes combinações de serapilheira, com características diferenciadas quanto à quantidade acumulada de nutrientes, lignina, polifenóis, capacidade de retenção de água, entre outros (CORREIA; ANDRADE, 1999).

O elevado conteúdo de matéria orgânica (MO) encontrado nos solos estudados representa a reserva potencial dos nutrientes necessários para a araucária, na condição de baixa fertilidade encontrada nos solos, nas três áreas estudadas. No entanto, a qualidade deste material orgânico, dado pelo histórico de formação de cada área, aparenta ser diferente e pode estar associada a diferentes composições vegetais encontradas nas áreas, influenciando o tipo de MOS; bem como a quantidade e qualidade dos nutrientes disponibilizados pela mesma, uma vez que os parâmetros químicos que apresentaram diferenças entre as áreas (pH, P, Ca e Mg) têm sua disponibilidade intimamente relacionada com a quantidade e tipo de MO presente no solo.

2.3.2 Atributos microbiológicos do solo

Características químicas do solo avaliadas através da mensuração dos valores de pH, conteúdo de matéria orgânica (MO), disponibilidade de nutrientes, entre outros, influenciam no crescimento e desenvolvimentos das plantas, bem como na atividade dos microrganismos presentes no solo e na estrutura das comunidades microbianas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; SHING et al., 2006). Tais características são dependentes do tipo de vegetação, condições climáticas, além, de práticas de manejo que possam influenciar na disponibilidade de nutrientes e processos biológicos.

Os valores de carbono da biomassa microbiana (CBM), atividade respiratória basal ($C-CO_2$), quociente metabólico (qCO_2) e relação CBM:COT diferiram estatisticamente ($P < 0,05$) entre as áreas estudadas. Para o carbono orgânico total (COT) não houve diferença estatística entre as áreas de FN, RF e RQ. Os maiores teores de CBM foram observados na FN, sendo 44,6 e 66,1% superiores aos teores encontrados no RF e no RQ, os quais não diferiram entre si (Tabela 4). Os resultados mostram que a FN apresenta o maior reservatório proporcional da matéria orgânica ativa, quando comparado ao RF e ao RQ.

A BM é a principal responsável pela decomposição dos resíduos orgânicos, pela ciclagem de nutrientes e pelo fluxo de energia dentro do solo, exercendo sua influência tanto na transformação da MO, quanto na estocagem de carbono e nutrientes minerais, ou seja, na liberação e imobilização de nutrientes nos ecossistemas terrestres (FEIGL et al., 1998; JENKINSON; LADD, 1981). Esse papel torna-se ainda mais importantes nos solos ácidos e de

baixa fertilidade natural que caracterizam grande parte dos solos dos ecossistemas florestais brasileiros.

Tabela 4 – Caracterização microbiológica do solo, na camada de 0-20 cm de profundidade, em áreas de floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima (RQ), no PECJ

Atributos	FN	RF	RQ
CBM ($\mu\text{g g}^{-1}$ de C na BM)	$400,2 \pm 108,5 \text{ a}^1$	$276,8 \pm 46,4 \text{ b}$	$240,9 \pm 60,2 \text{ b}$
C-CO ₂ ($\mu\text{g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ de C-CO ₂ no solo)	$108,8 \pm 5,5 \text{ a}$	$91,7 \pm 9,2 \text{ b}$	$95,6 \pm 20,2 \text{ b}$
$q\text{CO}_2$ ($\mu\text{g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ de C-CO ₂ na BM)	$0,27 \pm 0,07 \text{ b}$	$0,30 \pm 0,03 \text{ b}$	$0,39 \pm 0,06 \text{ a}$
COT (g kg^{-1} de C no solo)*	$87,2 \pm 43,9 \text{ a}$	$79,3 \pm 15,6 \text{ a}$	$91,5 \pm 20,6 \text{ a}$
Relação CBM:COT (%)*	$4,5 \pm 1,6 \text{ a}$	$3,4 \pm 0,6 \text{ b}$	$2,6 \pm 0,8 \text{ b}$

¹Valores são médias \pm desvio padrão ($n=10$). Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste LSD ($P < 0,05$). CBM, carbono da biomassa microbiana; C-CO₂, respiração basal; $q\text{CO}_2$, quociente metabólico; COT, carbono orgânico total do solo.

*Para o cálculo da análise canônica discriminante estes atributos foram eliminados devido ao efeito de colinearidade.

Estudos em ecossistemas florestais naturais ou introduzidos permitem verificar uma grande amplitude nos teores de CBM encontrados. Esses valores podem variar desde aproximadamente $215 \mu\text{g g}^{-1}$ em florestas com eucalipto e *Pinus* sp. na região de Viçosa, MG (GAMA-RODRIGUES; GAMA-RODRIGUES; BARROS, 1997), até cerca $1.600 \mu\text{g g}^{-1}$ em solos da Mata da Serra, em Poços de Caldas, MG (CARNEIRO, 2000). No Brasil, são poucos os trabalhos que envolvem o estudo de atributos biológicos em florestas do bioma Mata Atlântica, entre elas, a Floresta Ombrófila Mista conhecida como Floresta de Araucária.

Baretta et al. (2005), ao avaliarem o impacto da queima tradicional do campo nativo e do monocultivo de *Pinus* sp. no Planalto Sul Catarinense sobre atributos microbiológicos do solo encontraram os maiores teores de CBM (1.600 mg kg^{-1} de C na BM) na mata nativa com predomínio de *Araucaria angustifolia*. Nos anos de 2003 e 2004, um estudo preliminar no PECJ avaliou atributos microbiológicos do solo em dois períodos de amostragem (inverno e verão), o qual envolveu as mesmas áreas de FN e RF, e uma área diferente para o RQ. Considerando o mesmo período de amostragem ao realizado no presente estudo (inverno), as áreas de FN e RF apresentaram, respectivamente, os maiores teores para o CBM, não diferindo entre si; enquanto, o RQ apresentou os menores teores para o atributo (CARVALHO, 2005).

No presente estudo, a área de RQ também apresentou os menores teores de C acumulado na BM, porém não estatisticamente significativo à área de RF (Tabela 4). Práticas como a

derrubada da floresta, introdução de espécies exóticas e/ou naturais (reflorestamentos), queima da vegetação, entre outras, provocam a queda inicial com elevação posterior do nível de biomassa microbiana, determinando, uma nova distribuição das comunidades microbianas ao longo do perfil do solo (CERRI; VOLKOFF; EDUARDO, 1985; MARCHIORI JÚNIOR; MELO, 2000). Quando comparados a solos bem preservados ou de vegetação natural, os menores valores da BM são normalmente encontrados em áreas degradadas pela mineração ou florestas queimadas, seguidos por solos sujeitos à inundação, cultivo intenso ou contaminação com metais pesados (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Sistemas florestais permitem um maior aporte de material orgânico ao solo, principalmente em suas camadas mais superficiais. Este maior aporte tende a favorecer o incremento do teor de carbono orgânico do solo (COT), o qual serve como fonte de nutrientes a atividade metabólica das comunidades microbianas, responsáveis pela manutenção da produtividade dos ecossistemas naturais (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; WARDLE; HUNGRIA, 1994) através da ciclagem dos nutrientes minerais contidos na liteira vegetal e na MO, constituindo um sistema de equilíbrio (SALATI; VOSE, 1984).

A biomassa microbiana é uma fração significativa da MOS, normalmente sugerida como indicador sensível e precoce de mudanças na dinâmica da MOS e seus efeitos sobre atributos físicos e químicos, resultantes das diferentes formas de manejo e uso do solo (DALAL, 1998; JOHNSON et al., 1991; LI; ALLEN; WOLLUM II, 2004). Dessa maneira, a BM é um indicador eficaz de alterações no solo por causas naturais e/ou antropogênicas, antes mesmo da detecção significativa de alterações nos teores do COT.

Os dados obtidos no estudo corroboram a sensibilidade da BM na detecção de alterações ambientais. As áreas de FN, RF e RQ não apresentaram diferenças significativas quanto aos teores de COT (87,2; 79,3 e 91,5 g kg⁻¹ C no solo) (Tabela 4). Carvalho (2005), em seu estudo conduzido nos anos de 2003 e 2004, não encontrou diferença para o teor de COT entre as áreas de FN e RF (58,4 e 51,71 g kg⁻¹ de C no solo, respectivamente); apenas a área RQ apresentou diferença quanto a este atributo.

A utilização do COT, no entanto, pode ser útil no estudo da avaliação da dinâmica da MO em áreas submetidas a diferentes condições de manejo, ou mudança de uso da terra. Baretta et al. (2005), ao estudarem o impacto da queima tradicional e do monocultivo do *Pinus* sp., no município de Lages, SC, encontraram os maiores teores de COT (80 g kg⁻¹ de C no solo) na área

de mata nativa com predomínio de araucária quando comparada ao reflorestamento com pinus, ao campo nativo e ao campo nativo queimado, os quais não diferiram entre si. Marchiori Júnior e Melo (2000) encontraram na mata natural sobre Latossolo roxo maiores teores de COT ($37,2 \text{ g kg}^{-1}$ de C) quando comparados a sistemas florestais convertidos a sistemas agrícolas há diferentes períodos de tempos. Fialho, Borges e Barros (1991), ao analisarem química e fisicamente um Latossolo Vermelho-Amarelo no município de Viçosa, Mg, sob mata natural, pastagem e plantação de eucalipto, encontraram os maiores teores de COT na área de mata nativa quando comparada aos demais sistemas.

Fatores que alteram os teores de MOS normalmente provocam também alterações na BM. Tal característica torna-se particularmente evidente quando ocorre adição de resíduos de plantas ao solo (DALAL; HENDERSON; GLASBY, 1991; SORENSON, 1983), ou quando ocorre um decréscimo no teor de MO (BONDE; SCHNURER; ROSSWALL, 1988; WEST; ROSS; COWLING, 1986). No entanto, além da quantidade a qualidade da MO que entra no sistema, representa um importante fator regulador da atividade microbiana. Adições de resíduos de alta qualidade, que incluem compostos com baixo conteúdo de lignina e alta capacidade de decomposição, podem aumentar a relação entre o C microbiano e o C orgânico do solo (CBM:COT) (POWLSON; BROOKES; JENKINSON, 1987; SAFFIGNA et al., 1989).

Os atributos químicos dos solos estudados sugerem uma nova condição de equilíbrio para o RQ (Tabela 3; item 2.3.1). Porém, os atributos microbiológicos demonstram que embora quimicamente a FN e o RQ estejam mais similares, do ponto de vista microbiológico o solo sob RQ é mais semelhante ao encontrado na área de RF. Isto porque, embora os três sistemas não tivessem apresentado diferença quanto aos teores encontrados para o COT, a qualidade do material orgânico presente nas três áreas pode apresentar diferenças.

A diminuição da população microbiana na camada subsuperficial do solo, em determinados sistemas, pode ser explicada, principalmente, por condições menos favoráveis para o desenvolvimento de microrganismos, como, por exemplo, menor aeração do solo e menor disponibilidade de MO facilmente decomponível (BARETTA et al., 2005; LUIZÃO; CAMPISTA; COSTA, 1991), explicando parcialmente a menor capacidade de acúmulo de C na BM das áreas RF e RQ, quando comparadas a FN, bem como a menor relação CBM:COT encontrada nessas áreas. A FN apresentou uma maior relação entre o CBM e o COT do solo

(4,5%) quando comparada às áreas de RF e RQ (3,4 e 2,6%, respectivamente), as quais não diferiram entre si (Tabela 4).

As maiores relações CBM:COT encontradas na FN sugerem maior eficiência das comunidades microbianas presentes na área em imobilizar uma maior fração do C da MO mineralizável (MALUCHE-BARETTA et al., 2007). Além, de sugerir uma maior qualidade do resíduo orgânico presente na área (POWLSON; BROOKES; JENKINSON, 1987; SAFFIGNA et al., 1989). Isso porque, em resíduos de maior qualidade, o C e o N presentes na cobertura vegetal morta e nos compostos derivados da mesma são, de maneira geral, aproveitados imediatamente pela BM, como demonstrado em estudos com isótopos (AMATO; LADD, 1980; LADD; OADES; AMATO, 1981; OCIO; MARTINEZ; BROOKES, 1991).

Dados de literatura indicam que a relação CBM:COT de solos agrícolas e de florestas com pH próximo a 7 são muito similares, e podem variar entre 2 e 4,4%. Quando inferior a 2%, a relação CBM:COT é crítica, e indica baixa disponibilidade de C para o crescimento das populações microbianas do solo (ANDERSON, 2003; JENKINSON; LADD, 1981). Em solos de florestas, as comunidades microbianas tendem a se adaptar a acidez, sem perdas significativas de sua capacidade de mineralização e imobilização de C (ANDERSON, 2003; WARDLE; HUNGRIA, 1994).

Anderson (2003) sugere que a relação CBM:COT no solo possa ser utilizada como um indicador de estabilidade do ambiente em diferentes tipos de ecossistemas, devido, principalmente, a sua rápida capacidade de resposta à mudanças ambientais, e que a utilização conjunta do quociente metabólico ($q\text{CO}_2$) e da relação CBM:COT, pode caracterizar a atividade basal da comunidade microbiana de um solo, e contribuir para a definição do perfil eco-fisiológico do ecossistema.

Distúrbios e mudanças no uso do solo afetam as comunidades microbianas bioquímicas que nele habitam, e esse impacto pode ser detectado através de mudanças nas atividades bioquímicas das populações microbianas (MALUCHE-BARETTA et al., 2007). Essas atividades podem ser avaliadas através da respiração basal (quantidade de C- CO_2 liberada do solo), normalmente utilizada como um indicador da atividade microbiana total no solo (ANDERSON, 2003). Mais sensível a distúrbios no ambiente, e usualmente utilizado como indicador ecofisiológico, o $q\text{CO}_2$ representa a relação entre a quantidade de CO_2 liberado do solo por

unidade de CBM (ANDERSON; DOMSCH, 1993; ANDERSON, 2003; MALUCHE-BARETTA et al., 2007).

Com base nos resultados de liberação de C-CO₂ do solo, verificou-se maiores atividades microbianas na área de FN (108 $\mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$ de C-CO₂ no solo), seguida das áreas de RQ e RF (91,7 e 95,6 $\mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$ de C-CO₂ no solo, respectivamente), as quais não diferiram entre si (Tabela 4). Considerando-se o $q\text{CO}_2$, observa-se que a maior atividade de mineralização do C orgânico do solo ocorreu na área de RQ (0,4 $\mu\text{g } \mu\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ de C-CO₂ na BM) (Tabela 4). As áreas de FN (0,3 $\mu\text{g } \mu\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ de C-CO₂ na BM) e RF (0,3 $\mu\text{g } \mu\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ de C-CO₂ na BM) não diferiram entre si (Tabela 4).

Estes resultados corroboram as observações de Baretta et al. (2005), os quais encontraram maiores quantidades de C-CO₂ liberado do solo em áreas de mata nativa com araucária e reflorestamento com pinus, quando comparado ao campo nativo e ao campo nativo queimado. Observam também menor $q\text{CO}_2$ na área de mata nativa e campo nativo do que as áreas de reflorestamento com pinus e campo nativo queimado. Ao contrário Carvalho (2005), encontrou na mesma região deste estudo, no período de inverno, as maiores taxas de liberação de C-CO₂ no solo da área de RQ e as menores taxas nas áreas de FN e RF, as quais não diferiram entre si. Para o $q\text{CO}_2$, o autor não encontrou diferenças significativas entre as áreas estudadas.

Durante séculos o fogo é utilizado como prática de manejo para o preparo e fertilização do solo a ser cultivado (FEIGL et al., 1998). Em ecossistemas florestais, a incidência de incêndios espontâneos pode auxiliar no processo de colonização de algumas espécies vegetais e aumentar a disponibilidade imediata de nutrientes (NETTO; SANQUETTA; BRENA, 2006). No entanto, a intensidade e frequência de ocorrência de incêndios podem contribuir, entre outros aspectos, para alteração dos estoques de C do solo, aumento da concentração de gases responsáveis pelo efeito estufa na atmosfera, e modificação na distribuição e atividade da BM (FEIGL et al., 1998).

O aumento temporário da disponibilidade de K, Ca e Mg e aumento do pH, e redução nos teores de alumínio trocável, resultantes da queimada (RHEINHEIMER et al., 2003) favorece o crescimento rápido de uma população microbiana de oportunistas, gerando desequilíbrio e, conseqüentemente, maiores perdas de C na forma de CO₂. Com o passar do tempo, o efeito da queimada resulta em maior saturação por Al e maior acidez potencial, bem como menores teores

de Mg na camada superficial do solo (HERINGER; JACQUES, 2002; JACQUES, 2002). Essas alterações resultam na reestruturação da comunidade microbiana do solo.

Embora os estoques totais de COT não tenham sido diferentes entre as áreas estudadas, os maiores valores encontrados para o $q\text{CO}_2$ da área de RQ sugerem que as populações microbianas do solo desta área apresentam maior requerimento energético para sua manutenção e, conseqüentemente, maior taxa de decomposição da MO, o que poderá ocasionar ao longo do tempo, um decréscimo do estoque e qualidade da MO, comprometendo a ciclagem de nutrientes (GAMA-RODRIGUES, 1999).

2.3.3 Análise canônica discriminante (ACD) de atributos químicos e microbiológicos do solo

Com os dados das dez variáveis mensuradas em três áreas, o número máximo de funções canônicas discriminantes permitidas (FCD) é dois. A ACD demonstrou na primeira e segunda função canônica discriminante (FCD1 e FCD2) uma alta correlação canônica, 91,6 e 84,1%, respectivamente, sendo as duas funções ajustáveis para explicar as diferenças encontradas nas áreas para os valores dos atributos químicos: $\text{pH}_{\text{CaCl}_2}$, H^+Al , P, K, Ca, Mg e MO, e microbiológicos: CBM, C-CO_2 e $q\text{CO}_2$.

As FCD1 e FCD2 devem ser avaliadas conjuntamente, pois contribuem significativamente para a proporção da variação entre as áreas, o que é confirmado pelo critério do teste de relação de probabilidade. O teste estatístico multivariado de Wilks' Lambda demonstrou haver diferenças significativas entre as áreas estudadas ($P < 0,0001$) para as FCD1 e FCD2. Analisando os valores de ponderação (FCD1, 5,22; FCD2, 2,42), observou-se que a FCD1 explicou 68,3% da variação encontrada nas áreas estudadas, dentro dos atributos químicos e microbiológicos analisados, tendo a FCD2 explicado 31,7% da variação restante, não explicada pela FCD1 (Figura 5). A Figura 5 apresenta as relações entre as FCD1 e FCD2 das áreas e os coeficientes canônicos padronizados (CCP). Observa-se que as FCD1 e FCD2 discriminam as três áreas estudadas (FN, RF e RQ).

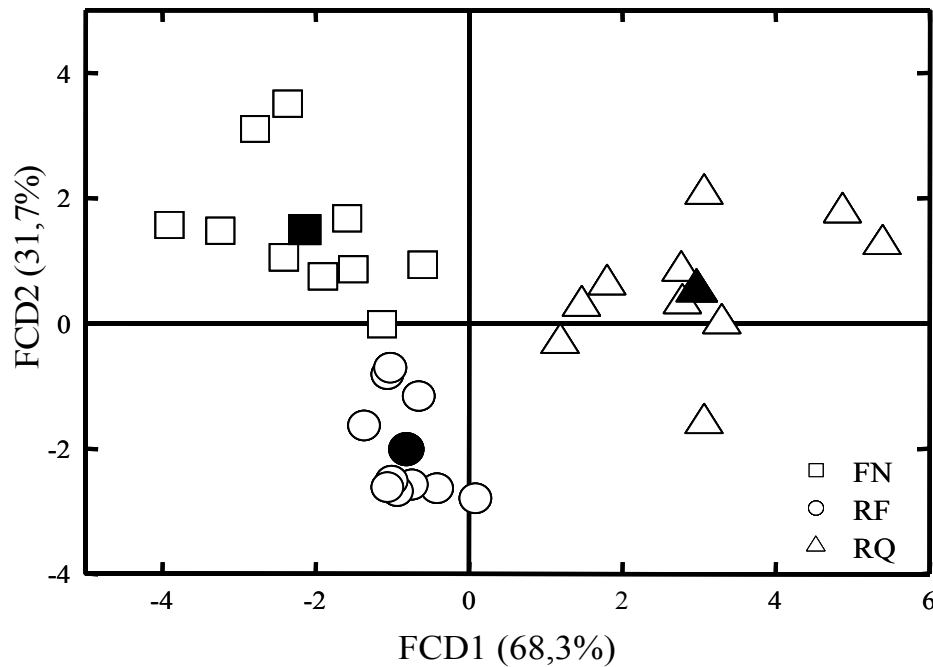


Figura 5 – Relação entre a primeira (FCD1) e segunda função canônica discriminante (FCD2) e os coeficientes canônicos padronizados (CCP) de atributos químicos e microbiológicos do solo em áreas de floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF), e reflorestamento de araucária com queima (RQ), no PECJ. Símbolo preto representa o valor médio dos CCP

A ANOVA dos CCP medidos pelo teste LSD ($P < 0,05$) das médias de todos os coeficientes, mostrou dentro da FCD1 e FCD2 que todas as áreas foram significativamente diferentes entre si (Tabela 5). Na FCD1 a área de RQ apresentou a maior média, seguida do RF e da FN (Tabela 5). Enquanto, para a FCD2, a área de FN apresentou a maior média, seguida das áreas de RQ e RF (Tabela 5).

Tabela 5 – Análise da variância média dos coeficientes canônicos padronizados (CCP) da primeira e segunda função canônica discriminante (FCD1 e FCD2) referentes aos valores de atributos químicos e microbiológicos do solo em áreas de floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima (RQ), no PECJ

Áreas	FCD1	FCD2
FN	-2,146 c	1,492 a
RF	-0,822 b	-2,013 c
RQ	2,968 a	0,521 b

Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre pelo teste LSD ($P < 0,05$).

O CCP explica o comportamento, sob o ponto de vista multivariado, dos diferentes atributos para promover a separação entre as áreas, enquanto o coeficiente de correlação (r)

fornece informações univariadas da contribuição individual de cada atributo, independente dos demais (MALUCHE-BARETTA et al., 2006). Usualmente, adota-se como melhor parâmetro para avaliação do efeito de separação gerada pelos atributos dentro das áreas estudadas, os valores da taxa de discriminação paralela (TDP), que representa o produto dos coeficientes CCP e r (MALUCHE-BARETTA et al., 2006).

Para o TDP, valores positivos indicam efeito de discriminação das áreas, sendo que os atributos com os maiores TDPs apresentam maior peso na discriminação das áreas. Valores negativos expressam efeito de supressão do atributo na discriminação das áreas, ou seja, expressam semelhanças entre as florestas para o atributo estudado.

A discriminação das áreas FN, RF e RQ baseia-se nos maiores valores significativos das FCD1 e FCD2, para a TDP, os quais determinam elevada disponibilidade de nutrientes e/ou alta taxa microbiológica, medida por valores elevados de CBM, C-CO₂, e baixos de q CO₂. Dos atributos avaliados, o quociente metabólico (q CO₂) na FCD1 responde por quase a totalidade da discriminação entre as áreas FN, RF e RQ (Tabela 6). Esses dados corroboram estudos que indicam o q CO₂ como um bom indicador de qualidade ambiental em sistemas naturais e agrícolas (ANDERSON, 2003; GAMA-RODRIGUES, 1999; WARDLE; HUNGRIA, 1994).

Tabela 6 – Coeficiente canônico padronizado (CCP), coeficiente de correlação (r) e coeficiente da taxa de discriminação paralela (TDP) para a função canônica discriminante 1 e 2 (FCD1 e FCD2), dos atributos químicos e microbiológicos da camada de 0-20 cm de profundidade do solo, de áreas de floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima (RQ), no PECJ

Atributos	CCP		R		TDP	
	FCD1	FCD2	FCD1	FCD2	FCD1	FCD2
pH _{CaCl2}	0.573	-0.096	0.283	-0.323	0.1619	0.0312
H+Al	-1.402	-0.411	-0.011	0.195	0.0161	-0.0800
P	1.346	1.192	0.063	0.760	0.0845	0.9062
K	0.533	0.109	-0.015	0.278	-0.0078	0.0302
Ca	0.600	-0.392	-0.087	0.391	-0.0523	-0.1534
Mg	-1.398	0.210	-0.128	0.396	0.1789	0.0833
MO	0.930	-0.238	0.049	0.099	0.0456	-0.0236
CBM	-0.219	0.199	-0.377	0.361	0.0824	0.0719
C-CO ₂	-0.837	0.276	-0.206	0.486	0.1727	0.1343
q CO ₂	0.771	0.208	0.412	0.000	0.3180	0.0001

Baretta et al. (2005), ao estudar o efeito do monocultivo do pinus e da queima do campo nativo em solos do Planalto Catarinense, tendo como área de referência uma mata nativa com

araucária, identificou o CBM como o principal atributo responsável pela discriminação entre as áreas de estudo, por meio da ACD. O quociente metabólico (qCO_2) não discriminou as áreas estudadas na FCD1 (88% da variação encontrada), mas foi o atributo de maior peso na separação das mesmas na FCD2 (10% da variação encontrada) (BARETTA et al., 2005). Ao aplicar a ACD ao estudo de sistemas de produção de maçãs orgânico e convencional no município de Urupema, SC, Maluche-Baretta et al. (2006), observaram que o CBM foi o atributo que mais contribuía para discriminar os sistemas estudados, seguido pelo qCO_2 e pela relação NBM:NT.

Em menor proporção, porém ainda significativos para a discriminação das áreas, considera-se o teor de Mg e o pH do solo (Tabela 6). Aproximadamente 32% da variação restante dos dados (Figura 5) nos permitem dizer que a discriminação das áreas estudadas é complementada na FCD2 pelo teor de P, quase na sua totalidade, com pequena contribuição da medida da atividade respiratória dos microrganismos (C-CO₂) (Tabela 6).

Dos atributos discriminados pela ACD na FCD1 através da sua TDP, o qCO_2 apresentou maior peso individual (r ; comportamento univariado) na formação dos eixos canônicos (funções), mesmo não apresentando um dos maiores valores para o CCP (Tabela 6). O teor de Mg apresentou valores altos para o CCP e para o r , enquanto o pH, semelhantemente ao qCO_2 , apresentou valores altos para o r , com menor contribuição multivariada (CCP) (Tabela 6). Para a FCD2, os atributos P e C-CO₂ apresentaram os maiores valores para o CCP e o r (Tabela 6).

Esses dados demonstram a importância da utilização da TDP como parâmetro para discriminação de atributos responsáveis pela separação de áreas. Isto porque, ao considerar simultaneamente o peso dos índices gerados pela ACD (CCP e r), é diminuído o erro na contribuição de cada atributo para a discriminação de áreas e/ou tratamentos, uma vez que a utilização única dos valores de CCP pode selecionar atributos que no conjunto contribuem bastante para a discriminação, mas apresentem baixa resposta individual (coeficiente de correlação), o que aconteceu para o teor de H+Al na FCD1, no presente estudo.

Embora o teor de H+Al tenha apresentado o maior valor do CCP (-1,402) na FCD1, a baixa contribuição individual deste atributo desqualifica-o, através de sua baixa TDP que considera o peso dos índices anteriores (contribuição individual e multivariada), para a contribuição significativa na discriminação das áreas (Tabela 6).

O comportamento multivariado dos dados (CCP) nos permite dizer que no conjunto de todas as variáveis o H+Al, P e Mg são atributos contrastantes entre as áreas estudadas, e que um

menor teor de H+Al correlaciona-se com baixos teores de Mg e uma maior disponibilidade de P. Porém, desses atributos, apenas o Mg na FCD1, e o P na FCD2, permitem discriminar as três áreas estudadas (Tabela 6).

Fatores que afetam os organismos e, indiretamente, são influenciados pelo pH, incluem, a disponibilidade e toxicidade de nutrientes minerais. Pouco se sabe sobre a resposta da biomassa microbiana a disponibilidade de nutrientes minerais como o Mg e o P. O Mg tem sua disponibilidade diretamente associada ao pH do solo e é essencial para o processo fotossintético das plantas, por ser um constituinte primário da clorofila (HAVLIN et al., 2005) além de participar de reações metabólicas e ativação enzimática de processos celulares de microrganismos (NELSON; COX, 2005). Solos ácidos com elevada saturação por alumínio podem causar deficiência de Mg nas plantas, bem como solos com elevado conteúdo de K, por competição na absorção do nutriente pela planta (HAVLIN et al., 2005).

O P é um elemento importante para todas as formas de vida, entre elas plantas e microrganismos, que tem o nutriente como constituinte de biomoléculas como ácidos nucléicos e ATP (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Os níveis de P limitam o crescimento e o desenvolvimento das espécies vegetais, por ser um elemento diretamente relacionado com os processos de armazenamento e transferência de energia para manutenção de processos fisiológicos, entre eles a fotossíntese (HAVLIN et al., 2005). Para a microbiota do solo, assim como o C, N e S, o P participa de funções vitais no seu metabolismo e crescimento, sendo o P acumulado na biomassa microbiana, uma fração lábil deste nutriente. A espécie araucária é micorrizo-dependente (ALBUQUERQUE, 2003; MOREIRA-SOUZA, 2003), sendo a disponibilidade do P um fator determinante para a manutenção da associação.

Albuquerque (2003), ao estudar aspectos ecológicos das populações de fungos micorrízicos arbusculares e suas relações em sistemas de reflorestamento e mata nativa de *Araucaria angustifolia* no município de Campo Belo do Sul, SC identificou através da ACD o pH e o alumínio trocável como os atributos químicos responsáveis pela discriminação das áreas estudadas na FCD1, nas duas épocas avaliadas.

Tanto a BM como a biomassa vegetal, relacionam-se positivamente com o pH do solo. No entanto, a biomassa dos solos ácidos pode apresentar-se bem adaptada a tal condição (WARDLE; HUNGRIA, 1994); como por exemplo, no caso dos solos ácidos de florestas onde processos de nitrificação ocorrem a valores de pH inferiores a quatro, devido tanto a existência de microsítios,

quanto, a uma população de nitrificadores heterotróficos mais tolerantes à acidez do que os autotróficos (MOREIRA, SIQUEIRA; 2006). Estudos indicam que, em solos de floresta, o pH do solo exerce uma função controladora sobre as taxas respiratórias da BM, afetando o $q\text{CO}_2$ e a relação CBM:COT (ANDERSON, 2003; ANDERSON; DOMSCH, 1993). Assim, estes parâmetros em conjunto (pH, $q\text{CO}_2$ e relação CBM:COT) deviam ser utilizados como indicadores de qualidade do solo (ANDERSON, 2003).

A predominância da FCD1 na contabilidade da variação entre as áreas de FN, RF e RQ sugerem que comparações futuras das mesmas, necessitam apenas focar-se no $q\text{CO}_2$, pH e teores de Mg. No entanto, ao considerar uma contribuição relativamente alta (31%) da FCD2, o elemento P, também deve ser considerado para estudos futuros das áreas.

2.3.4 Estrutura das comunidades de *Bacteria* e *Archaea*

Para as áreas avaliadas, a separação dos *amplicons* do gene rRNA 16S de *Bacteria* e *Archaea* obtidos por DGGE, revelou complexo padrão específico de bandejamento, indicando diferentes estruturas de comunidades de *Bacteria* e *Archaea* em cada área (Figuras 6 e 7). Bandas com mesma motilidade nos géis presentes em todas as amostras sugerem a presença de ribotipos comuns a todas as áreas, muito embora uma banda possa conter mais de um ribotipo.

A análise de agrupamento hierárquico mostra as similaridades entre as comunidades de *Bacteria* nas áreas de FN, RF e RQ, com base na presença ou ausência dos *amplicons* do gene rRNA 16S (Figura 8). De maneira geral, para *Bacteria*, a análise de agrupamento hierárquico mostrou a existência de variabilidade espacial nas áreas amostradas, mas foi suficiente para definir dois grandes agrupamentos (I e II) (Figura 8). O primeiro grande agrupamento (I) é formado por amostras das áreas de FN (FN1, FN2, FN6, FN7, FN4, FN3, FN5, FN7, FN10, FN9 e FN8) e RQ (RQ7, RQ5, RQ4, RQ3, RQ2, RQ6 e RQ1) (Figura 8). O segundo agrupamento (II) é formado pela totalidade das amostras do RF com algumas amostras da área de RQ (RQ8, RQ9 e RQ10) (Figura 8).

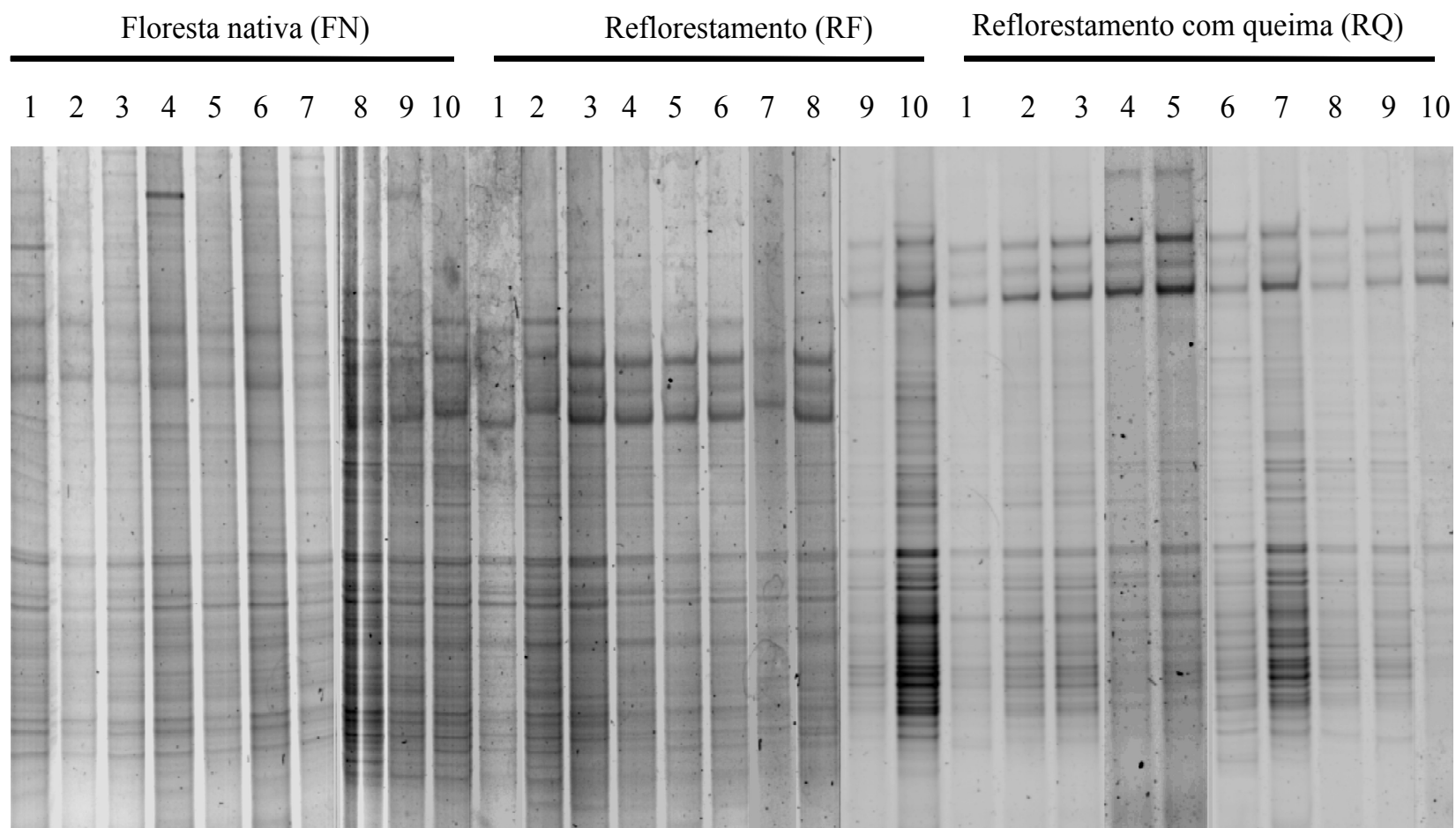


Figura 6 – Eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante dos *amplicons* da região V3 do gene rRNA 16S de *Bacteria*, das amostras de solo coletadas na profundidade de 0-20 cm, em áreas de floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima (RQ), no PECJ. 1-10: numeração das repetições dentro de cada área amostrada

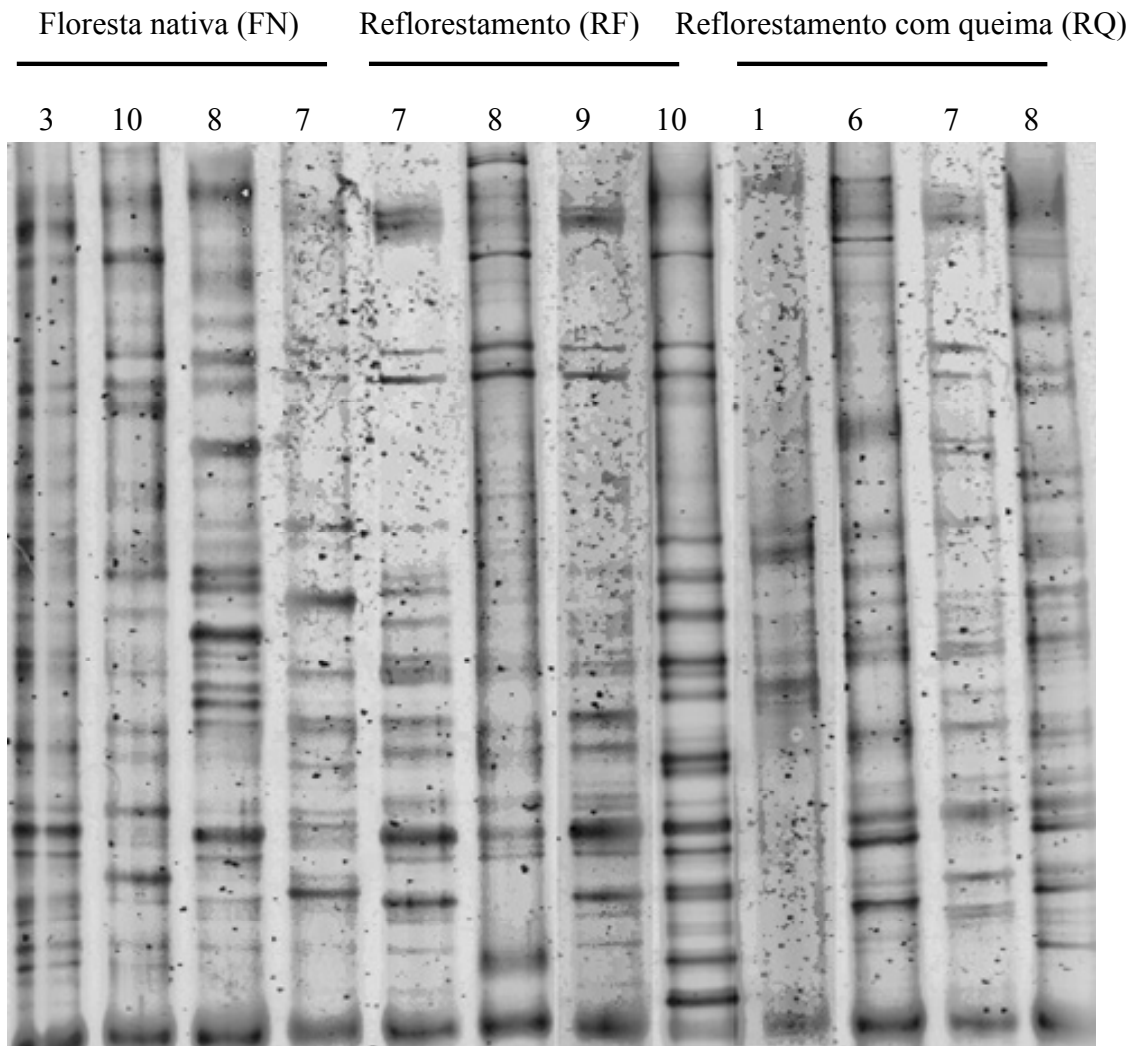


Figura 7 – Eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante dos *amplicons* da região V3 do gene rRNA 16S de *Archaea*, das amostras de solo coletadas na profundidade de 0-20 cm, em áreas de floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima acidental (RQ), no PECJ. 1-10: numeração das repetições dentro de cada área de amostragem

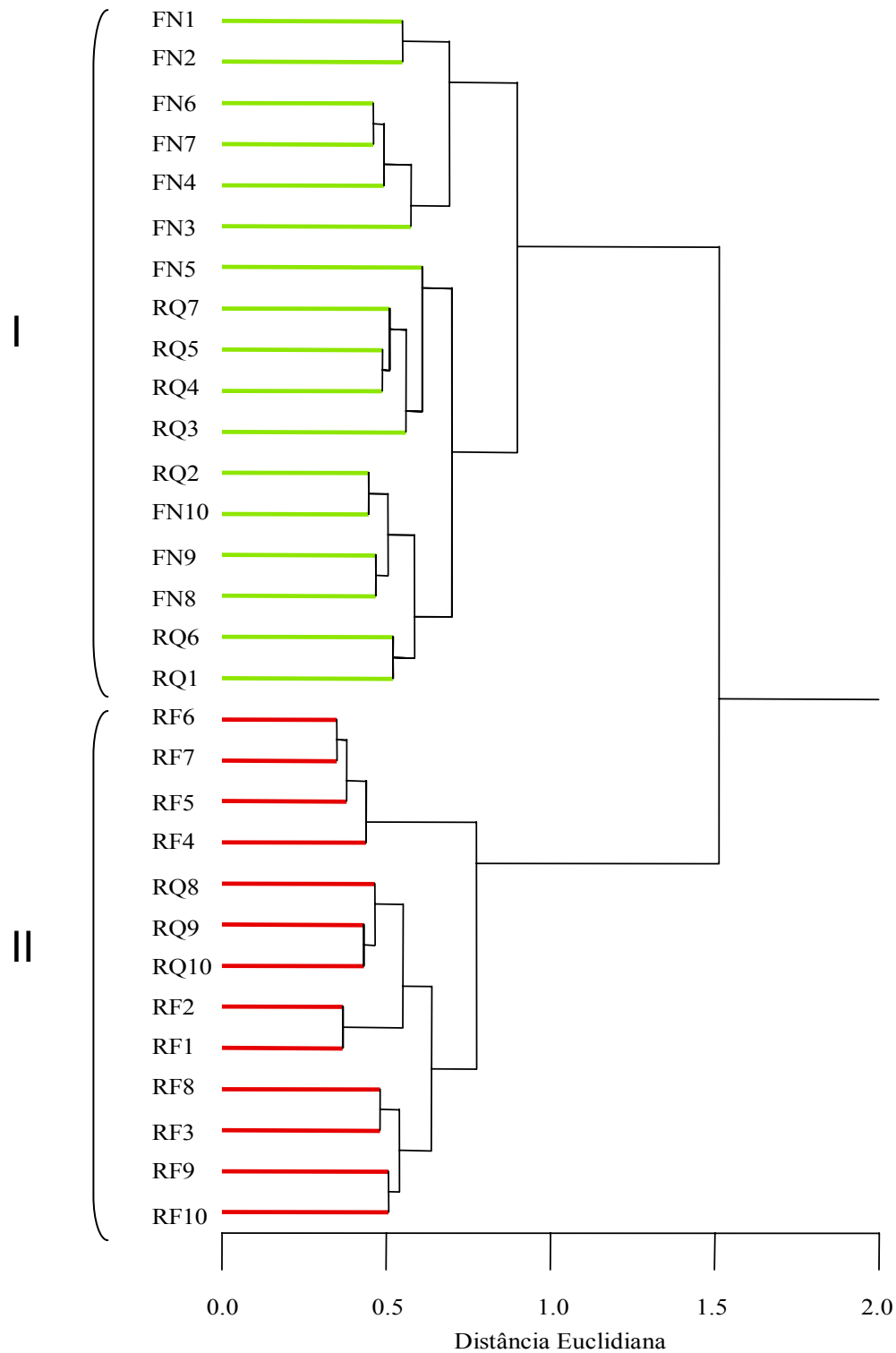


Figura 8 – Agrupamento hierárquico com base na separação por DGGE de *amplicons* do gene rRNA 16S de *Bacteria* de amostras de solo coletadas na profundidade de 0-20 cm, em áreas de floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima (RQ), no PECJ. O número seguido à abreviação das áreas representa a repetição da amostragem utilizada na análise

A análise de agrupamento hierárquico para *Bacteria* demonstrou haver uma nítida separação entre a área de RF em relação às áreas de FN e RQ (Figura 8). Mesmo apresentando algumas amostras com diversidade similar a encontrada para alguns pontos da área RF, o RQ apresentou maior distância em relação à área de RF, e o agrupamento hierárquico indicou haver certa similaridade entre as áreas de RQ e FN (Figura 8). Os dados ainda nos permitem supor, que o RQ está evoluindo para uma condição próxima à encontrada na área de FN.

Relativamente pouco se sabe sobre a variação espacial da estrutura de comunidades microbianas nos solos (LAVERMAN et al., 2005). Fatores reguladores da diversidade como: temperatura, pH, umidade, concentrações de nitrogênio e até mesmo a inibição alelopática devido a compostos fenólicos, não explicam completamente a variação espacial das comunidades microbianas nos solos florestais (De BOER; KESTER, 1996; GRIFFITHS et al., 2000). A grande heterogeneidade, característica dos solos determina diferentes microsítios com condições químicas e microbiológicas distintas. As áreas de estudo apresentaram uma alta variabilidade dos atributos químicos encontrados entre os diferentes pontos amostrados (Tabela 3; item 2.3.1), conseqüentemente, uma maior variabilidade microbiológica é esperada nesses diferentes pontos.

Para a *Archaea*, a análise de agrupamento hierárquico mostrou que as amostras dentro de cada área não necessariamente se agruparam, apresentando uma variabilidade espacial ainda maior do que a encontrada para a *Bacteria* (Figura 9).

De maneira geral, a análise de agrupamento hierárquico das áreas estudadas permitiu a identificação de dois grandes agrupamentos (I e II) (Figura 9). O primeiro grande agrupamento (I) é formado por repetições amostradas nas áreas de FN (FN7), RF (RF7, RF9) e RQ (RQ1 e RQ7) (Figura 9). O segundo agrupamento (II) é formado por amostras RQ8, FN8, FN10, FN3, RQ6, RF8 e RF 10 (Figura 9).

Considerava-se que o domínio *Archaea* era composto por microrganismos que viviam em ambientes extremos em condições anóxicas. No entanto, a alta diversidade de micro-ambientes encontrados no solo, evidencia a presença de *Archaea* em ambientes mais amenos, como o solo, sedimentos e ecossistemas marinhos, demonstrando a contribuição deste grupo na biomassa global (FORTERRE, 1997; RÖLING et al., 2004; SANDAA; ENGER; TORSVIK, 1999; SEKIGUCHI, 2006). Pouco se sabe sobre a diversidade destes organismos em solos de ambientes de florestas. Faoro (2006), ao estudar a diversidade de organismos do domínio *Bacteria* e *Archaea* em solos da Mata Atlântica paranaense, não conseguiu obter resultados quanto à

amplificação de suas amostras para o domínio *Archaea*. No presente estudo, apenas algumas repetições dentro de cada área conseguiram ser amplificadas, o que pode estar relacionado a uma pequena quantidade do DNA destes organismos presentes nos pontos amostrados.

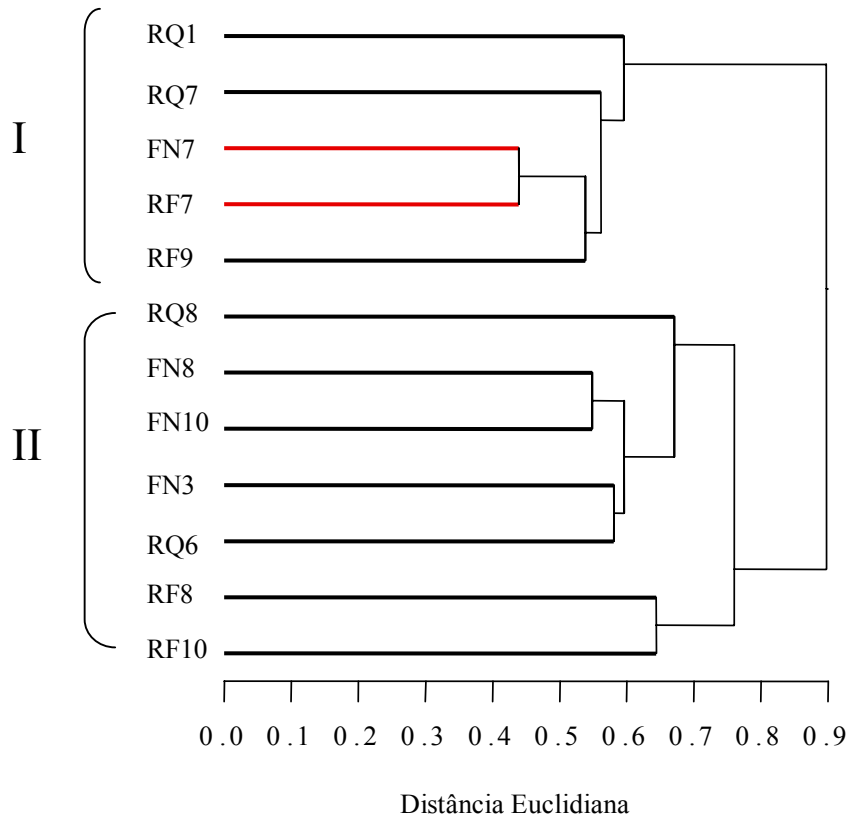


Figura 9 – Agrupamento hierárquico com base na separação por DGGE de *amplicons* do gene rRNA 16S de *Archaea* de amostras de solo coletadas na profundidade de 0-20 cm, em áreas de floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima (RQ), no PECJ. O número seguido à abreviação das áreas representa a repetição da amostragem utilizada na análise

Os resultados da análise de escala multidimensional (*Non-metric Multidimensional Scaling* - NMDS) baseada nos perfis de bandejamento do gene rRNA 16S de *Bacteria* e *Archaea* após DGGE, de cada área, são apresentados na Figura 10. A Figura 10A, baseada na representação bidimensional das amostras para *Bacteria* mostrou clara separação entre as áreas de FN e RF, com a área de RQ numa condição intermediária as duas áreas, como também visto pelo agrupamento hierárquico.

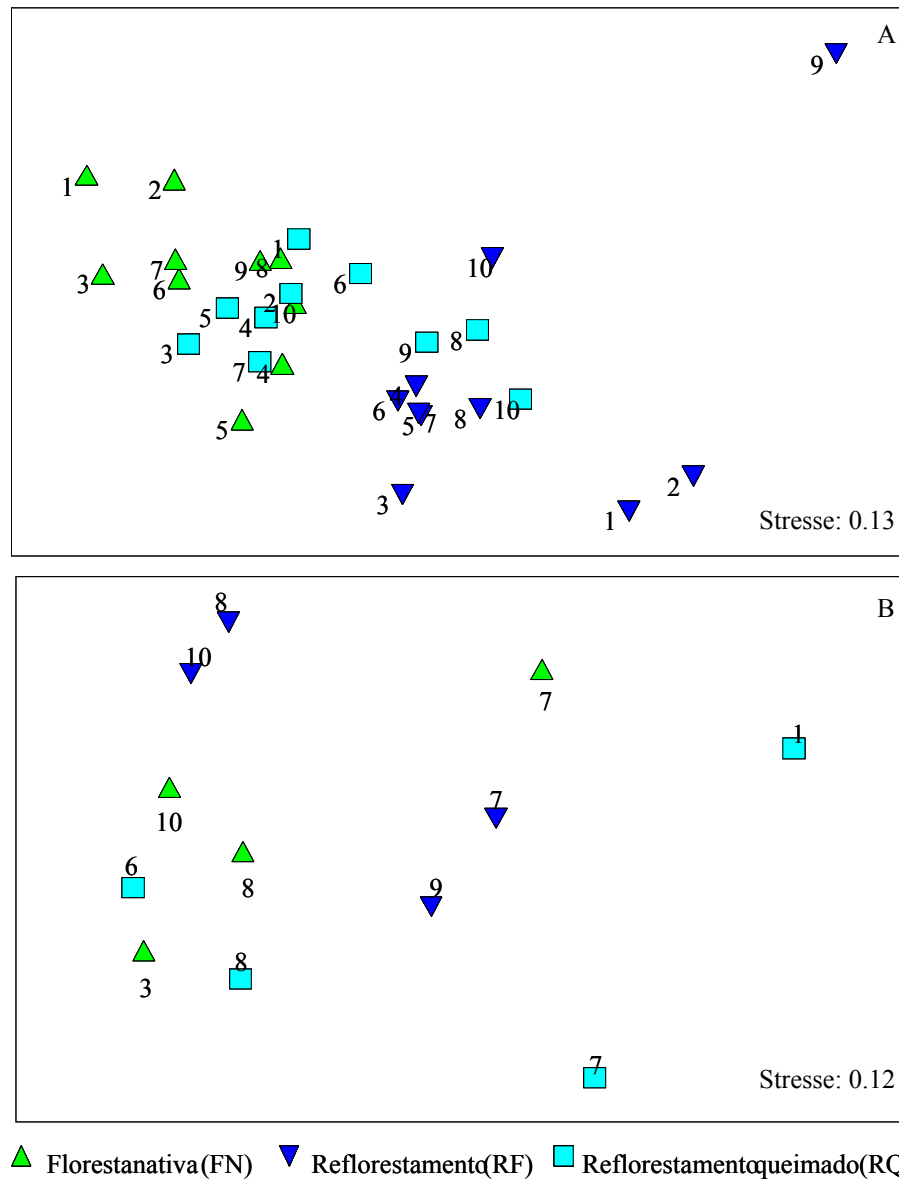


Figura 10 – Análise de escala multidimensional (NMDS) dos perfis de *amplicons* do gene rRNA 16S de *Bacteria* (A) e *Archaea* (B) após DGGE, das áreas de floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima (RQ), no PECJ

A NMDS baseia-se na representação gráfica das amostras comparando as distâncias entre elas com as suas respectivas (d_i) similaridades, e avaliando a relação entre essas medidas por meio da regressão linear. A confiabilidade da regressão é dada pelo seu nível de *estresse*. Para o presente trabalho o nível de *estresse* aplicado para *Bacteria* e *Archaea* é de 0,13 e 0,12; respectivamente, o que indica que a representação bidimensional é válida, porém não totalmente nítida quanto às separações das áreas, e recomenda-se a sua interpretação juntamente com um

outro método. A representação bidimensional da análise de escala multidimensional (NMDS) para *Archaea* não conseguiu separar as áreas estudadas (Figura 10B).

Complementando a representação gráfica obtida pela NMDS uma ANOSIM foi aplicada com o objetivo de discriminar as áreas, testando as diferenças entre os valores médios de similaridade entre amostras dentro de uma mesma área, verso as diferenças entre os valores médios de similaridade entre as áreas avaliadas. Para *Bacteria*, a ANOSIM revelou diferenças significativas (R global = 0,397; $P < 0,001$); e o resultado do teste *Pairwise* (pareamento) mostrou que as três áreas são significativamente diferentes entre si, embora a representação gráfica mostre certa similaridade entre a área de RQ e as áreas de FN e RF (Tabela 7). Para *Archaea* a ANOSIM não mostrou nenhuma diferença significativa entre as áreas estudadas (R global = 0,021; $P > 0,001$) (Tabela 7).

Tabela 7 – Resultado do teste *Pairwise* (pareamento) baseado nos perfis de *amplicons* do gene rRNA 16S de *Bacteria* e *Archaea* após DGGE, das áreas de floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima (RQ), no PECJ. (* $P < 0,05$, ** $P < 0,001$)

Áreas	Teste <i>Pairwise</i>
	<i>Bacteria</i>
FN, RF	0,639**
FN, RQ	0,220*
RF, RQ	0,299*
	<i>Archaea</i>
FN, RF	-0,026
FN, RQ	0,135
RF, RQ	-0,021

A plotagem bidimensional dos dados de *Bacteria* mostra que as áreas estudadas são estatisticamente diferentes quanto ao perfil de *amplicons* do gene rRNA 16S. A estrutura de comunidade bacteriana na área de RQ estaria evoluindo para uma situação mais similar a estrutura das comunidades encontradas na FN. No entanto, a completa confirmação da sensibilidade do teste multivariado em discriminar as três áreas estudadas quanto a diferente estruturação de suas comunidades bacterianas será apresentado mais adiante através da análise de clones de seqüências do gene rRNA 16S obtidas em cada área de estudo.

Com o objetivo de verificar a associação entre a estrutura das comunidades de *Bacteria* e *Archaea* com os atributos químicos mensurados nas três áreas, utilizou-se a matriz de ordenação gerada pela análise de escala multidimensional (NMDS) para o cálculo da análise indireta de

componentes principais (ACP), complementando os dados obtidos através da análise da estrutura de comunidades microbianas por PCR-DGGE do gene rRNA 16S. Para *Bacteria*, a dimensão 1 ou componente principal 1, explicou 69,6% da variabilidade dos dados, enquanto a dimensão 2 ou componente principal 2 explicou 30,4% da variabilidade restante, totalizando juntas 100% da variabilidade total dos dados. De maneira geral, evidenciou-se a disposição das áreas em quadrantes separados, com completa separação das áreas de FN e RF (Figura 11A).

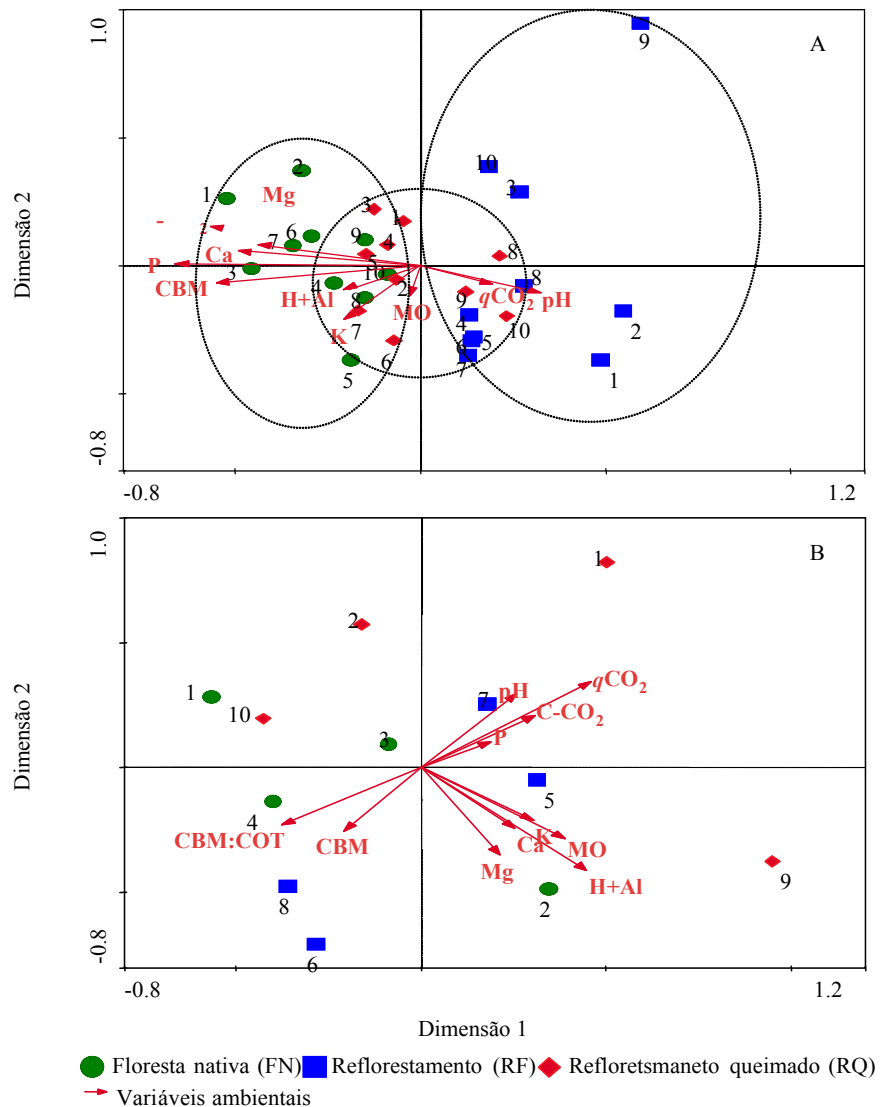


Figura 11 – Análise de componentes principais (ACP) com base no cálculo das coordenadas através da análise de escala multidimensional não-métrica (NMDS), dos perfis de *amplicons* do gene rRNA 16S de *Bacteria* (A) e *Archaea* (B) após DGGE. Variáveis ambientais explicativas medidas nos pontos de coleta de cada área de floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima (RQ), no PECJ. Variáveis ambientais selecionadas: pH CaCl_2 , M.O., H+Al, fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg)

A Figura 11A mostra uma maior associação entre a variabilidade do perfil de bandejamento do gene rRNA 16S de *Bacteria* para os pontos de amostragem da FN, aos maiores teores de P, Ca e Mg; enquanto a variabilidade da estrutura das comunidades de *Bacteria* em RF associa-se aos maiores valores de pH encontrados na área (Figura 11A). Os atributos responsáveis pela similaridade entre RQ e as áreas de FN e RF não estão bem definidos, não sendo clara a associação a variáveis químicas específicas (Figura 11).

A técnica de PCR-DGGE tem se mostrado uma ferramenta eficiente na detecção de mudanças na estrutura de comunidades microbianas em função de alterações ambientais, causadas por práticas de manejo e/ou associação à variabilidade de atributos químicos mensurados nas áreas (CLEGG, 2006). O presente estudo mostra uma relação direta entre atributos microbiológicos e químicos, e a ACD das áreas do PECJ evidenciou tal relação ao discriminar as áreas pelo conjunto dos pesos de seus atributos químicos e microbiológicos ao mesmo tempo ($q\text{CO}_2$, pH, P e Mg; item 2.3.3). Assim, os dados sugerem que a estrutura das comunidades microbianas avaliadas por PCR-DGGE do gene rRNA 16S pode ser um indicador eficaz de alterações ambientais.

Todos os atributos químicos (pH, P e Mg) associados à variabilidade de *amplicons* do gene rRNA 16S encontrado nas áreas, com exceção do Ca, foram discriminados pela ACD de atributos químicos e microbiológicos. Isso sugere que a ACD foi capaz de discriminar os atributos que direta ou indiretamente estão associados à variabilidade da diversidade bacteriana encontrada na área.

Maluche-Baretta et al. (2006), ao estudarem a correlação entre atributos microbiológicos e químicos mensurados em pomares de maçãs convencional e orgânico, verificaram através da análise de redundância obtida pela análise de correlação canônica (ACC), que 35% da variação total dos atributos microbiológicos foi explicada pela variação dos atributos químicos dos pomares, e que por sua vez, apenas 21% da variação total dos atributos químicos é explicada pela variação dos atributos microbiológicos das áreas de pomares convencional e orgânico. Esses dados confirmam a sensibilidade dos atributos microbiológicos às variações químicas encontradas, e reforçam sua utilização na predição de alterações no meio antes mesmo que modificações químicas e físicas substanciais aconteçam. Suas modificações podem indicar

mudanças químicas pouco perceptíveis, afetando substancialmente características microbiológicas do solo (MALUCHE-BARETTA et al., 2006).

Para a FN, uma maior ciclagem de nutrientes é realizada pela BM deste solo, como visto pelos dados microbiológicos (CBM) anteriormente apresentados neste trabalho. Entre os nutrientes ciclados pela microbiota deste solo estão o Ca e o Mg, e principalmente o P, que tem a MO como a principal fonte. Desta maneira, a maior disponibilidade de nutrientes aumenta a oferta para as plantas, e para a própria microbiota que se utilizará destes elementos para o crescimento de sua biomassa (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; WARDLE; HUNGRIA, 1994). Por outro lado, a estrutura da comunidade bacteriana do solo da área de RF mostra-se fortemente associada ao pH deste solo na seleção bacteriana encontrada nesta área.

Para a os perfis de bandeamento do gene rRNA 16S de *Archaea* após DGGE, a dimensão 1 ou componente principal 1 explicou 59,8% da variabilidade dos dados, enquanto, a dimensão 2 ou componente principal 2 explicou 40,2% da variabilidade restante. Conjuntamente, as dimensões 1 e 2 respondem por 100% da variabilidade total dos dados. A alta variabilidade dos dados encontrados para *Archaea* não permitiram uma visualização da associação entre os pontos dentro de cada área e atributos químicos específicos (Figura 11B).

As áreas diferiram significativamente em muitos parâmetros, atribuídos a diferenças na vegetação presente em cada área e ao histórico de uso das mesmas, os quais afetam quantitativamente e qualitativamente a entrada de material orgânico e, conseqüentemente os atributos químicos e microbiológicos (DINESH et al., 2003). As análises multivariadas apresentaram-se como importantes ferramentas no estudo de diversidade microbiana, e permitiu aumentar a sensibilidade da resposta da análise de perfis de *amplicons* do gene rRNA 16S de *Bacteria* e *Archaea* após DGGE, sendo os atributos químicos do solo úteis para a interpretação dos resultados obtidos.

2.3.5 Seqüenciamento de clones do gene rRNA 16S de *Bacteria*

2.3.5.1 Afiliação filogenética de seqüências dos clones do gene rRNA 16S

A diversidade de *Bacteria* nas áreas de FN, RF e RQ foi analisada através do seqüenciamento da região V1-V3 do gene rRNA 16S, amplificada a partir do DNA

metagenômico do solo. Do total de 166, 172 e 192 clones sequenciados a partir de bibliotecas construídas de cada área, 118, 143 e 180 seqüências foram consideradas válidas quanto a sua qualidade (identificação de ambos os iniciadores e tamanho de seqüências), e utilizadas em análises posteriores. A afiliação filogenética das seqüências de nucleotídeos representando bactérias dos solos analisados foi feita utilizando-se o programa RDPquery (2006).

A distribuição da freqüência dos táxons de *Bacteria* presentes nas três áreas estudadas é apresentada na Tabela 8. Do total das seqüências analisadas 17,9; 31,9 e 24,4% das seqüências do solo de FN, RF e RQ, respectivamente, não puderam ser classificadas ao nível de filo (Tabela 8). Os resultados da afiliação filogenética indicam bactérias de nove filos distintos distribuídos entre as áreas estudadas (Figura 12A). A área de FN apresentou o maior número de filos, tendo clones de rDNA 16S representando nove filos (Figura 12A). Para as áreas de RF e RQ, foram detectados representantes de seis filos (Figura 12A).

Bactérias do filo *Proteobacteria* foram as mais freqüentes, representando aproximadamente 48% do total das seqüências de rDNA 16S das áreas FN e RQ e 38% das seqüências da área RF (Figura 12A). O segundo filo de maior ocorrência nas áreas foi *Acidobacteria* com aproximadamente 21, 24 e 19% do total de seqüências, respectivamente, para as áreas FN, RF e RQ; seguido de bactérias do filo *Actinobacteria* com 6, 3 e 4% do total de seqüências de rDNA 16S das áreas FN, RF e RQ (Figura 12A). Filos como *Bacteroidetes* e *Firmicutes* foram encontrados com menor freqüência nas três áreas, representando aproximadamente 3, 1 e 1% e 1, 1 e 2%, respectivamente, nas áreas FN, RF e RQ (Figura 12A). Os filos *Planctomycetes* e *Verrucomicrobia* foram detectados apenas na área FN, enquanto os filos *Cyanobacteria* e *Gemmatimonadetes* não foram detectados em RQ e RF, respectivamente (Figura 12A).

Dentro dos nove filos detectados, as seqüências foram afiliadas a treze classes, sendo as classes *Alphaproteobacteria* e *Acidobacteria* as de maior freqüência, com aproximadamente 33, 20 e 36% e 21, 22 e 19% do total de seqüências, respectivamente, nas áreas FN, RF e RQ (Figura 12B). Na área FN foram detectadas representantes de onze classes, seguida das áreas RF e RQ, com dez e oito classes, respectivamente (Figura 12B). Classes como *Actinobacteria*, *Gammaproteobacteria* e *Betaproteobacteria* foram abundantes nas três áreas, e representam aproximadamente 6, 3 e 4%, 4, 5 e 4% e, 4, 6 e 2% do total das seqüências analisadas nas áreas FN, RF e RQ (Figura 12B).

Tabela 8 – Frequência (%) dos diferentes táxons de *Bacteria* encontrados em áreas de floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima (RQ), no PECJ

					(continua)		
Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	FN	RF	RQ
ND*	ND	ND	ND	ND	17.9	31.9	24.4
Acidobacteria	ND	ND	ND	ND	0.0	2.1	0.0
Acidobacteria	Acidobacteria	ND	ND	ND	0.0	3.5	2.8
Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	ND	ND	0.9	0.0	1.7
Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	ND	0.9	0.7	2.2
Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Acidobacterium	18.8	18.1	12.2
Actinobacteria	Actinobacteria	ND	ND	ND	0.9	1.4	1.7
Actinobacteria	Actinobacteria	Acidimicrobiales	Acidimicrobiaceae	Acidimicrobium	0.9	0.0	0.0
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	4.3	1.4	2.8
Bacteroidetes	ND	ND	ND	ND	0.9	0.7	0.6
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	ND	ND	1.7	0.7	0.0
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	ND	0.9	0.0	0.0
Cyanobacteria	Cyanobacteria	ND	ND	ND	0.9	0.7	0.0
Firmicutes	ND	ND	ND	ND	0.9	0.0	1.1
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	0.0	0.7	0.0
Firmicutes	Clostridia	ND	ND	ND	0.0	0.7	1.1
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	Gemmatimonadaceae	ND	0.9	0.0	0.0
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	Gemmatimonadaceae	Gemmatimonas	0.0	0.0	1.7
Planctomycetes	Planctomycetacia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	ND	0.9	0.0	0.0

Tabela 8 – Frequência (%) dos diferentes táxons de *Bacteria* encontrados em áreas de floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima, no PECJ

(continuação)							
Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	FN	RF	RQ
Proteobacteria	ND	ND	ND	ND	5.1	4.2	4.4
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	ND	ND	ND	5.1	2.1	3.9
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	ND	0.9	0.0	0.0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	Caulobacter	0.9	0.0	0.0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND	ND	4.3	6.9	12.2
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	ND	0.9	0.7	1.1
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	Methylocapsa	0.9	0.0	0.0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	Methylocella	0.0	0.7	0.6
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	ND	2.6	0.7	2.2
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	Bradyrhizobium	4.3	4.2	3.9
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	ND	0.0	0.7	2.2
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Rhodoplanes	8.5	2.1	7.8
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	ND	ND	0.9	2.1	0.0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acetobacteraceae	ND	3.4	0.0	0.6
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acetobacteraceae	Acidisphaera	0.0	0.0	0.6
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acetobacteraceae	Stella	0.0	0.0	0.6
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rickettsiales	Incertae sedis 4	Odyssella	0.9	0.0	0.0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	ND	ND	ND	0.0	0.7	0.0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	ND	ND	1.7	2.8	0.0
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia	2.6	2.1	1.1
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Incertae sedis 5	ND	0.0	0.0	0.6
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Herbaspirillum	0.0	0.7	0.0
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	ND	ND	ND	0.0	0.0	1.7
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Cystobacteraceae	ND	0.0	0.7	0.6
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Polyangliaceae	ND	0.0	1.4	0.0
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Polyangliaceae	Chondromyces	0.9	0.0	0.0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	ND	ND	ND	1.7	4.2	2.2

Tabela 8 – Frequência (%) dos diferentes táxons de *Bacteria* encontrados em áreas de floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima (RQ), no PECJ

Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	(conclusão)		
					FN	RF	RQ
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	ND	0.0	0.0	0.6
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	0.9	0.7	0.6
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	ND	0.0	0.0	0.6
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Frateruia	0.9	0.0	0.0
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Nevskia	0.9	0.0	0.0
Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	ND	ND	0.9	0.0	0.0

ND* – Não definida

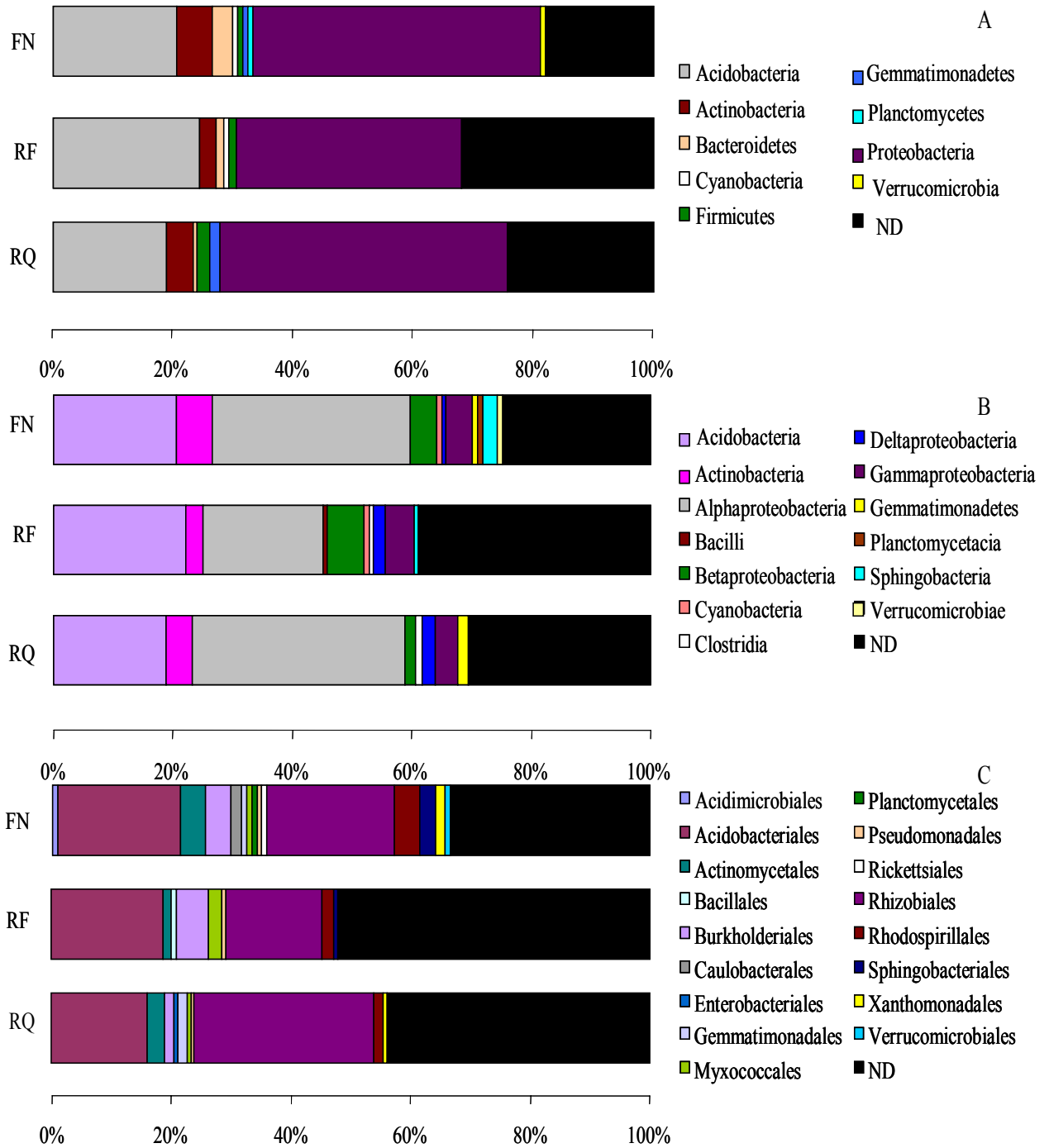


Figura 12 – Frequência relativa de seqüências de rDNA 16S de *Bacteria* classificadas em diferentes filós (A), classes (B) e ordens (C), em áreas de floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima (RQ), no PECJ

A classe *Deltaproteobacteria* foi detectada nas três áreas, representando aproximadamente 1-2% do total das seqüências das áreas FN, RF e RQ (Figura 12B). As classes *Planctomycetacia* e *Verrucomicrobiae* foram detectadas somente na área FN, representando cada

uma cerca de 1% do total das seqüências; assim como a classe *Bacilli* detectada apenas na área RQ e representando 1% do total das seqüências (Figura 12B). *Cyanobacteria* e *Sphingobacteria* foram detectadas apenas nas áreas FN e RF; enquanto *Gemmatimonadetes* foram detectadas apenas nas áreas FN e RQ (Figura 12B). Nas áreas RF e RQ cerca de 1% do total de seqüências foram classificadas na classe *Clostridia* (Figura 12B).

Do total das seqüências classificadas usando o RDPquery nas áreas estudadas, dezessete ordens foram detectadas (Figura 12C). A ordem *Rhizobiales* foi a detectada com maior freqüência, representando aproximadamente 21, 16 e 30% do total das seqüências das áreas FN, RF e RQ (Figura 12C). *Acidobacteriales* representando 21, 19 e 16% do total das seqüências na FN, RF e RQ, respectivamente (Figura 12C). Ordens como *Actinomycetales* e *Rhodospirillales* representaram aproximadamente 4, 1 e 3% e 4, 2 e 2% do total das seqüências das áreas FN, RF e RQ, respectivamente (Figura 12C). Quando comparada à RF e RQ, a FN apresentou o maior número de ordens, sendo as ordens *Acidimicrobiales*, *Caulobacterales*, *Planctomycetales*, *Rickettsiales* e *Verrucomicrobiales* detectadas apenas nesta área (Figura 12C). A ordem *Bacillales* foi detectada apenas na área RF, enquanto a ordem *Enterobacteriales* apenas na área RQ (Figura 12C).

Considerando o filo mais abundante, *Proteobacteria*, todas as classes encontradas estiveram presentes nas três áreas estudadas (Figura 13).

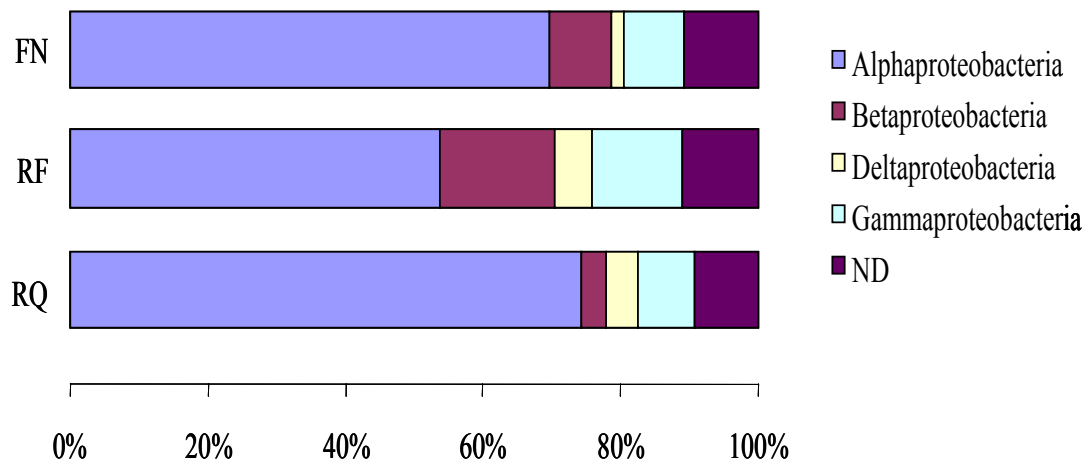


Figura 13 – Frequência relativa de seqüências de rDNA 16S de *Bacteria*, classificadas com o RDPquery, das diferentes classes de *Proteobacteria* em áreas de floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima (RQ), no PECJ

A classe *Alfaproteobacteria* foi a de maior frequência com aproximadamente 70, 54 e 74% do total das seqüências analisadas nas áreas FN, RF e RQ, seguida das classes *Gammaproteobacteria* e *Betaproteobacteria* com aproximadamente 9, 13 e 8% e 9, 17 e 3% do total das seqüências encontradas nas áreas FN, RF e RQ, respectivamente (Figura 13). Nos solos das áreas FN, RF e RQ cerca de 2, 6 e 5% das seqüências foram classificadas como *Deltaproteobacteria* (Figura 13).

Análise de clones de bibliotecas do gene rRNA 16S possibilita a identificação de microrganismos mais abundantes no ambiente estudado e, possivelmente os responsáveis pelas principais atividades bioquímicas em seus ecossistemas (HUNGENHOLTZ; GOEBEL; PACE, 1998). Tem sido observado, com base nas seqüências do gene rRNA 16S, que bactérias do solo afiliam-se a pelo menos 32 filos, muitos deles constituídos de uma ou poucas espécies (p.e. *Thermomicrobia*, *Chrysiogenetes*, *Fibrobacteres* e *Deferribacteres*), enquanto outros, são constituídos de milhares de espécies (p.e. *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Gemmanmonadetes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* e *Firmicutes*), com uma cobertura de 92% da diversidade bacteriana (JANSSEN, 2006). Embora haja pelo menos 52 filos bacterianos (RAPPE; GIOVANNONI, 2003), apenas 24 são reconhecidos pelo Manual de Bergey, sendo que nos solos aparentemente um pequeno número destes está presente (GARRITY; BELL; LILBURN, 2004).

Analisando as seqüências do gene rRNA 16S verificou-se que as comunidades microbianas encontradas no solo das áreas FN, RF e RQ foram diferentes entre si, sugerindo um participações nos processos biogeoquímicos diferenciados. Desta maneira faz-se necessário a descrição dos diferentes táxons e os processos associados a eles, como a seguir:

Acidobacteria - O filo *Acidobacteria* é formado por organismos generalistas, capazes de crescer em diferentes ambientes (BORNEMAN et al., 1996; FELSKE et al., 1998; HACKL et al., 2004; KIM et al., 2007). Apresentando oito subdivisões (HUGENHOLTZ; GOEBEL; PACE, 1998), sendo três delas particularmente abundantes em solos; porém, com apenas três gêneros formalmente descritos dentro do filo (GARRITY; BELL; LILBURN, 2004). A ampla distribuição deste filo sugere que os organismos a ele pertencentes ocupem micronichos nos solos de diferentes ambientes, e que semelhantemente a membros do filo *Proteobacteria* entre outros;

organismos do filo *Acidobacteria* sejam, provavelmente, bastante diversos fisiologicamente e ecologicamente (BARNES; TAKALA; KUSKE, 1999).

Membros do filo *Acidobacteria* podem representar aproximadamente 20% das comunidades bacterianas dos solos, sendo a amplitude desta cobertura entre 5 e 46% (JANSSEN, 2006), e são na maioria espécies ácido-tolerantes (GARRITY; HOLT, 2001; HIRASHI; KISHIMOTO; KOZAKO, 1995). Essa maior adaptabilidade em condições de meio ácido justifica o melhor desenvolvimento destas bactérias em solos de florestas (KIM et al., 2007; PEREIRA et al., 2006), corroborando os dados encontrados neste estudo (Tabela 8).

Faoro (2006), em trabalho pioneiro de avaliação da diversidade microbiana em solos da floresta Atlântica Paranaense, comparou as seqüências de 754 clones do gene rRNA 16S com o banco de dados do RDP II e observou a predominância do filo *Acidobacteria*, com freqüência de 49% do total de seqüências analisadas. Em outros estudos envolvendo sistemas florestais brasileiros, como solos de terra preta e floresta primitiva da Amazônia Ocidental (KIM et al., 2007) e solos de floresta natural no Estado de São Paulo (PEREIRA et al., 2006), freqüências similares foram observadas. Para o presente estudo o filo *Acidobacteria* representou aproximadamente 20% do total de seqüências nas áreas FN, RF e RQ, sendo o gênero *Acidobacterium* o único identificado entre as seqüências (Figura 12).

Actinobacteria - O filo *Actinobacteria* é um dos principais filos dentro do domínio *Bacteria*, e seus membros compõem uma média de 13% das comunidades bacterianas dos solos, sendo a amplitude desta cobertura entre 0 e 34% (BOONE; CASTENHOLZ; GARRITY, 2001; JANSSEN, 2006). O filo é composto por uma única classe subdividida em três subclasses comuns nos solos: *Actinobacteridae*, *Acidimicrobidae* e *Rubrobacteridae* (GARRITY; HOLT, 2001; JANSSEN, 2006). A classe *Actinobacteria* compreende quatro ordens, que incluem 39 famílias em 130 gêneros (GARRITY; HOLT, 2001). Nos diferentes ambientes, o filo *Actinobacteria* normalmente é formado por pequenas populações quando comparado a outros filos (BORNEMAN et al., 1996; BORNEMAN; TRIPLET, 1997; DUNBAR et al., 2002; PEREIRA et al., 2006), e é composto por bactérias Gram-positivas, normalmente termófilas e, com alto conteúdo de G+C (CAVALIER-SMITH, 2002; GAO; GUPTA, 2005).

Além de sua ampla distribuição nos mais variados ecossistemas terrestres, há um particular interesse econômico em organismos pertencentes ao filo *Actinobacteria* devido sua

capacidade de produção de antibióticos, exercendo o controle sobre o crescimento de outros grupos bacterianos (SILVEIRA et al., 2006).

O filo *Actinobacteria* foi o terceiro mais abundante no solo das três áreas, sendo que as áreas FN e RF apresentaram uma maior frequência destes organismos (Tabela 8). Espécies pertencentes ao filo *Actinobacteria* apresentam um papel importante na decomposição da MO e formação do húmus (GOODFELLOW; WILLIAMS, 1983). Tal característica poderia estar relacionada à maior frequência deste filo nos solos de maior conteúdo de matéria orgânica, como o caso das áreas FN e RQ, quando comparadas à área RF (Tabela 8). Sequências representando bactérias da ordem *Acidimicrobiales* foram encontradas apenas em FN, sendo uma sequência representante do gênero *Acidimicrobium* (família *Acidimicrobiaceae*), o qual possui uma espécie (*Acidimicrobium ferrooxidans*) envolvida na oxidação de formas reduzidas de Fe (Tabela 8). Tais bactérias utilizam Fe^{3+} como aceptor de elétrons na decomposição de compostos orgânicos, podendo indicar ambientes redutores ou problemas de drenagem no solo. A ordem *Actinomycetales* foi encontrada nas três áreas estudadas.

Ao comparar e estimar a diversidade bacteriana de comunidades simpátricas em solos de duas áreas, uma de floresta nativa e outra de arboreto de eucalipto adjacente, Silveira et al. (2006), encontraram um predomínio do filo *Actinobacteria* no solo sob monocultivo de eucalipto, quando comparado à floresta nativa. Os autores associaram a maior abundância do filo na área de monocultivo a uma instabilidade do sistema, o qual seleciona através dos exsudados radiculares, grupos dominantes como os dos actinomicetos, capazes de produzir esporos que são importantes estruturas de resistência para os microrganismos quando de distúrbios aplicados ao ambiente.

A considerável frequência sequências afiliadas a *Actinobacteria* nas três áreas estudadas pode estar associada a uma resposta a condições de estresse, já que microrganismos do filo *Actinobacteria* desenvolvem importante papel no solo ocupando nichos antes ocupados por bactérias menos tolerantes a estresses (RONDON et al., 2000; SILVEIRA et al., 2006).

Condições adversas podem incluir períodos de seca e baixa temperatura, como as encontradas durante a estação seca do período de coleta das amostras no PECJ (Figura 2). Possivelmente as comunidades bacterianas possam responder a esse estresse se reestruturando. Durante esse período, a seleção de populações mais tolerantes ao estresse, e com maior habilidade na decomposição do material orgânico acumulado no solo, poderá ocorrer. No entanto,

para a comprovação desta hipótese, são necessárias avaliações temporais das comunidades bacterianas.

Bacteroidetes – Membros do filo *Bacteroidetes* compõem em média 5% das comunidades bacterianas dos solos, sendo a amplitude desta cobertura entre 0 e 18% (JANSSEN, 2006). O filo é formado por três classes: *Bacteroidetes*, *Flavobacteria* e *Sphingobacteria*, sendo os membros da classe *Sphingobacteria* os mais comuns no solo (JANSSEN, 2006; LYDELL et al., 2004). Alguns membros deste grupo são aeróbios, enquanto outros são anaeróbios ou anaeróbios facultativos.

O filo *Bacteroidetes* foi detectado nas três áreas estudadas (Tabela 8). Porém, apenas a classe mais comum, *Sphingobacteria*, foi detectada entre as seqüências das áreas FN e RF, apresentando uma seqüência classificada na família *Sphingobacteriaceae* presente apenas em FN (Tabela 8). Espécies de *Sphingobacteria* participam da degradação de vários biopolímeros como celulose, quitina, pectina e proteínas (BJORNDOTTIR et al., 2006), o que justifica a maior freqüência de seqüências do gene rRNA 16S representando essas bactérias no solo da área FN, a qual apresenta maior diversidade vegetal e, conseqüentemente, maior diversidade de biopolímeros.

Firmicutes - Membros do filo *Firmicutes* compõem em média de 2% das comunidades bacterianas dos solos, sendo a amplitude desta cobertura entre 0 e 8% (JANSSEN, 2006). O filo é dividido em três classes, entre elas *Bacilli* e *Clostridia* possuem cerca de 214 gêneros, incluindo *Bacillus* e *Clostridium*, membros comuns de comunidades microbianas do solo (GARRITY; HOLT, 2001; JANSSEN, 2006). *Firmicutes* são bactérias Gram-positivas separadas em dois grandes grupos filogeneticamente distintos, cujos organismos podem ser, de maneira geral, discriminados de acordo com o teor de guanina e citosina (G+C) no DNA (GARRITY; HOLT, 2001). O grupo dos organismos com baixo teor de G+C é bastante heterogêneo e compreende bacilos, cocos e organismos pleomórficos, incluindo *Mycoplasma*, o qual não apresenta parede celular (CANHOS et al., 1997). Congrega os organismos do gênero *Clostridium*, as bactérias formadoras de ácido láctico (*Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp.) e vários cocos (*Ruminococcus* spp., *Peptococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Sarcina* spp. e *Staphylococcus* spp.) (CANHOS et al., 1997). O metabolismo pode inclui homo ou hetero-fermentativos aeróbios, e os organismos

podem ser micro-aeróbios, anaeróbios facultativos ou anaeróbios estritos. Os Gram-positivos formadores de esporos podem ser exemplificados pelos gêneros *Bacillus*, *Clostridium* e *Sporosarcina* (CANHOS et al., 1997).

O filo *Firmicutes* foi detectado nas três áreas estudadas, sendo a área RQ a que apresentou a sua maior frequência (Figura 12). Na área FN foram detectadas seqüências provavelmente representando novas classes de *Firmicutes*; já em RF, a maior parte das seqüências detectadas pertencem a gêneros conhecidos (Tabela 8). A área RQ teve suas seqüências classificadas dentro da classe *Clostridia* (Tabela 8).

Maiores frequências do filo *Firmicutes* tem sido encontrada em solos sob cultivo de tomate, feijão e milho (PEREIRA et al., 2006) e monocultivo com eucalipto (SILVEIRA et al., 2006), ambos no Estado de São Paulo, quando comparados a solos de floresta nativa. Segundo os autores a ocorrência de *Firmicutes* nesses sistemas agrícola/florestais pode estar associada a uma seleção pela planta e/ou pelo seu rápido crescimento em solos rico em nutrientes, próprios de sistemas agrícolas (PEREIRA et al., 2006; SILVEIRA et al., 2006). Por outro lado, membros dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium* são fixadores de nitrogênio, e podem contribuir para a nutrição de algumas espécies de planta (KUHNER; MATTHIES, 2000).

Alguns estudos com solos de florestas de diversas regiões do mundo têm mostrado baixa frequência dos organismos pertencentes a este grupo, é o caso da floresta Atlântica Paranaense (Faoro, 2006) e floresta boreal e tundra Ártica no Canadá (NEUFELD; MOHN, 2005). Kim et al. (2007), em solo de terra preta e floresta primitiva na Amazônia Ocidental e Hackl et al. (2004), em solos de florestas naturais na Áustria não detectaram seqüências afiliadas a este filo em seus estudos.

Gemmatimonadetes - O filo *Gemmatimonadetes* compõe uma média de 2% das comunidades bacterianas dos solos, sendo a amplitude desta cobertura entre 0 e 4% (JANSSEN, 2006); com apenas uma espécie de bactéria nomeada e descrita, *Gemmatimonas aurantiacus*, caracterizada como sendo Gram-negativa e heterotrófica aeróbia (GARRITY; BELL; LILBURN, 2004; ZHANG et al., 2003).

A diversidade fisiológica do grupo ainda está sendo estudada e os representantes deste grupo que habitam o solo são encontrados em uma grande amplitude filogenética, podendo conter um número discreto de táxons dentro das classes (RAPPE; GIOVANNONI, 2003). No presente

estudo uma baixa frequência destes organismos foram detectadas nas áreas FN e RQ (Figura 14). Para a área FN, uma única sequência foi classificada dentro do filo (família *Gemmatimonadaceae*, ordem *Gemmatimonadales*, classe *Gemmatimonadetes*); enquanto para a área RQ 2% do total de suas 180 seqüências foram classificadas no gênero *Gemmatimonas* (Tabela 8). Semelhantemente, Faoro (2006) encontrou que cerca de 2% do total de suas seqüências representavam bactérias do filo *Gemmatimonadetes* em solos da floresta Atlântica Paranaense.

Nenhuma seqüência representando este filo foi detectada em bibliotecas de solos de terra preta e floresta primitiva na Amazônia (KIM et al., 2007), florestas nativas no Estado de São Paulo (PEREIRA et al., 2006; SILVEIRA et al., 2006), floresta boreal e tundra Ártica no Canadá (NEUFELD; MOHN, 2005) ou, florestas naturais da Áustria (HACHL et al., 2004).

Dentre os filos com frequência de ocorrência menor que 1% nos solos FN, RF e RQ foram detectados *Cyanobacteria*, *Planctomycetes* e *Verrucomicrobia*.

Cyanobacteria - As cianobactérias são organismos fototróficos oxigênicos, compreendendo várias espécies formadoras de filamentos (GARRITY; HOLT, 2001). São organizadas em cinco subdivisões, que compreendem gêneros como *Anabaena*, *Dermocarpa* e *Oscillatoria*, encontradas em ambientes aquáticos e terrestres, sendo algumas espécies fixadoras de nitrogênio como, por exemplo, o gênero *Prochloron*, um simbiote marinho (WOESE et al., 1985). No presente estudo cerca de 1% do total das seqüências foram classificada dentro deste filo nas áreas de FN e RF, não podendo ser classificadas em táxons menores dentro da classe *Cyanobacteria* (Tabela 8). Pertencentes a este filo também foram encontrados em solos de floresta Atlântica Paranaense em baixa frequência (FAORO, 2006).

Planctomycetes – Membros do filo *Planctomycetes* compõem uma média de 2% das comunidades bacterianas dos solos, sendo a amplitude desta cobertura entre 0 e 8% (JANSSEN, 2006). O filo é considerado abundante em ambientes terrestres e marinhos (FUERST, 2005; GLOCKNER et al., 2003), dada a sua profundidade filogenética, que sugere que *Planctomycetes* seja composto pelo menos por três classes (DOJKA; HARRIS; PACE, 2000), e vários gêneros de importância ambiental.

O filo foi encontrado em baixa frequência neste estudo (Tabela 8), representado por uma única sequência classificada na área de FN. Membros deste filo também foram detectados em baixa frequência em solos de florestas brasileiras, como os estudados por Kim et al. (2007), na terra preta e floresta primitiva da Amazônia Ocidental; e Silveira et al. (2006), em solos de floresta nativa e monocultivo com eucalipto no Estado de São Paulo.

Os *Planctomyces* representam uma enigmática divisão bacteriana caracterizada por células que não contém peptidoglicano em sua parede celular, principal polímero estrutural de muitos membros do domínio *Bacteria* (FUERST, 2005; GLÖCKNER et al., 2003). Além de uma organização celular que envolve uma única compartimentalização, bem como a presença de estruturas celulares específicas vinculadas as espécies constituintes deste filo (FUERST, 2005; GLÖCKNER et al., 2003; JANSSEN, 2006). Como principais funções, bactérias *Planctomyces* catalizam importantes transformações nos ciclos globais do carbono e nitrogênio (GLÖCKNER et al., 2003), e representa o terceiro maior grupo microbiano processando genes de transferência para o C1, responsável por processos de oxidação no ciclo do metano (CHISTOSERDOVA et al., 2004). Pelo seu papel chave nas funções de transferência do C1, microrganismos do filo *Planctomyces* podem apresentar-se como potenciais responsáveis pela evolução do ciclo global do metano, representando um ancestral dos atuais metanogênicos do domínio *Archaea* e metanotróficos do filo *Proteobacteria* (CHISTOSERDOVA et al., 2004).

A classificação de seqüências pertencentes ao filo *Planctomyces* na área de FN, reforça o papel do aumento da biodiversidade em ambientes naturais. Quanto maior a biodiversidade maior será o número de organismos envolvidos em processos vitais de manutenção deste ecossistema. No presente estudo, os solos das áreas mais impactadas (RF e RQ) não apresentaram seqüências classificadas dentro deste filo microbiano (Tabela 8).

Verrucomicrobia – O filo *Verrucomicrobia* é dividido em cinco classes e compõem uma média de 7% das comunidades bacterianas dos solos, sendo a amplitude desta cobertura entre 0 e 21% (JANSSEN, 2006). Membros deste filo apresentam-se distribuídos em diversos ambientes através de inúmeros indivíduos (HEDLUND; GOSINK; STALEY, 1997; HUNGENHOLTZ; GOEBEL; PACE, 1998), os quais englobam bactérias Gram-negativas sensíveis à penicilina, sendo que algumas são capazes de produzir cápsulas de peptidoglicano (HEDLUND; GOSINK; STALEY, 1997).

Para o presente estudo o filo *Verrucomicrobia* esteve presente apenas na área de FN representando apenas 1% do total de suas seqüências (classe *Verrucomicrobiae*, ordem *Verrucomicrobiae*). Corroborando nossos dados Faoro (2006), encontrou baixa cobertura relativa de freqüências para o filo *Verrucomicrobia* (1 % do total) em suas seqüências de clones do rDNA 16S em solos da floresta Atlântica Paranaense; assim como Kim et al. (2007) e Silveira et al. (2006), em solos de terra preta e floresta primitiva da Amazônia Ocidental, e floresta nativa Paulista, respectivamente. Ao contrário, Pereira et al. (2006), encontraram ao caracterizar a comunidade bacteriana de solos de floresta nativa e cultivo com tomate, feijão e milho ambos no Estado de São Paulo, um aumento da freqüência relativa de seqüências do rDNA 16S classificadas no filo *Verrucomicrobia* na área de floresta nativa, que representou juntamente com o filo *Proteobacteria* o segundo mais abundante (19,3%) quando comparado ao solo da área sob cultivo, que apresentou apenas 6% das suas seqüências classificadas neste filo.

Uma provável associação à espécie vegetal também pode estar associada à ocorrência de indivíduos deste filo, é o que concluiu Silveira et al. (2006), ao compararem a diversidade microbiana encontrada em uma floresta nativa e um arboreto de eucalipto, ambos no Estado de São Paulo. Os autores encontraram na área sob monocultivo com eucalipto 19,83% das suas seqüências classificadas no filo *Verrucomicrobia* contra, aproximadamente, 2,24% do total de seqüências classificadas na área de floresta nativa. Semelhantemente, Hackl et al. (2004), encontraram ao estudar a composição de populações bacterianas que habitam solos de florestas naturais na Áustria Oriental, que o tipo vegetal e a condição climática podem selecionar para o aumento de um determinado grupo microbiano. Em seus estudos os autores encontraram o filo *Verrucomicrobia* como o segundo mais abundante na floresta de carvalho de Kolmberg sugerindo uma importância relativa do papel destes organismos nos solos de florestas desta região.

Embora muitos estudos evidenciam a presença de membros deste filo em inúmeros ambientes como o solo, no entanto pouco se sabe sobre a função destes organismos nos diferentes ambientes, e fatores que possam estar diretamente associados a sua presença. Lindström, Vrede e Leskinen (2004), ao estudarem fatores que afetam a composição do bacterioplâncton em diferentes profundidades em um lago na Suécia com diferentes tratamentos com P, verificou que a maior disponibilidade deste nutriente estaria associada a um favorecimento ao crescimento desta população. Para uma condição de solo, a maior disponibilidade de P na área de FN

justificaria a ocorrência deste filo na área, mas não explicaria a ausência de seqüências representantes deste filo na área de RQ, que também apresentou maiores teores do nutriente.

A intensificação dos distúrbios sejam eles naturais ou antrópicos, como os incêndios florestais espontâneos ou induzidos e, a derrubada da mata seguida do reflorestamento com espécies nativas, promove o desaparecimento de alguns grupos microbianos. Esta teoria provavelmente envolveria membros do filo *Planctomycetes* e *Verrucomicrobia* presentes apenas na área de FN. Ainda, a baixa freqüência de indivíduos deste filo na área poderia indicar para as condições de floresta com araucária da região, que esses grupos bacterianos estivessem diminuindo à medida que área nativa deixa de ser tão entocada e acentua-se a exploração turística da mesma. Avaliações futuras poderiam responder a tais hipóteses podendo até mesmo selecionar representantes destes filios como indicadores de *estresse*, mostrando a sensibilidade destes em diminuir sua freqüência de ocorrência ou até mesmo desaparecer quando distúrbios são aplicados a florestas de araucária.

Proteobacteria - O filo *Proteobacteria* representa o maior e mais diverso grupo de bactérias cultivadas, alocadas em cinco subdivisões: *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* e *Epsilonproteobacteria*, que compõem uma média de 39% das comunidades bacterianas dos solos, sendo a amplitude desta cobertura entre 10 e 77% (JANSSEN, 2006). Dos membros pertencentes a este filo de ocorrência freqüente nos solos, a maior representatividade está nas classes *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* e *Deltaproteobacteria*, todas representadas por seqüências detectadas nas três áreas de estudo (Tabela 8).

Os organismos pertencentes ao filo *Proteobacteria* apresentam coloração Gram-negativa e uma enorme diversidade de morfologia e metabolismo, mesmo dentro de uma mesma radiação filogenética, com aproximadamente 528 gêneros descritos (GARRITY; BELL; LILBURN, 2004). Espécies das classes *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria* são muito heterogêneas em suas características fisiológicas, e incluem organismos aeróbios e anaeróbios, fotossintéticos ou não, sendo distribuídos de forma generalizada nos ambientes terrestres e aquáticos, em um grande número de indivíduos (LEE et al., 2005).

Alguns estudos de diversidade bacteriana, como os realizados em solos de pastagens na Escócia (McCAIG; GLOVER; PROSSER, 1999) e solos cultivados e sob floresta no Brasil

(PEREIRA, 2003), evidenciam um predomínio de organismos pertencentes ao filo *Proteobacteria* quando comparado a outros filios. Para solos de ecossistemas florestais Chow et al. (2002), ao estudarem a rizosfera de *Pinus contorta* de solos de florestas no Canadá, encontraram 55% dos clones seqüenciados de biblioteca do gene rRNA 16S representados pelo filo *Proteobacteria*, sendo a classe *Alphaproteobacteria* a de maior abundância. Semelhantemente Neufeld e Mohn (2005), encontraram predomínio de *Proteobacteria* na afiliação taxonômica de suas seqüências de floresta boreal e tundra ártica no Canadá.

Solos de ecossistemas florestais como os de terra preta e floresta primitiva da Amazônia Ocidental (KIM et al., 2007), floresta Atlântica Paranaense (FAORO, 2006), florestas nativas no Estado de São Paulo (PEREIRA et al., 2006; SILVEIRA et al., 2006) e floresta natural na Áustria (HACKL et al., 2004), encontraram o filo *Proteobacteria* como o segundo filo de maior freqüência em seus estudos, sendo o filo *Acidobacteria* o mais freqüente nestes ecossistemas. Para todos esses estudos a classe *Alphaproteobacteria* foi à de maior freqüência dentro do filo *Proteobacteria*.

Fierer, Bradford e Jackson (2007), sugerem através da classificação ecológica de bactérias, que seja proposto que a abundância de organismos copiotróficos e oligotróficos nos solos seja regulada pela abundância de formas lábeis de C, e que as taxas de decomposição, as quais incluem a respiração heterotrófica do solo, variam diretamente com a abundância de bactérias copiotróficas. Por exemplo, em ambientes com baixa disponibilidade de C grupos oligotróficos como os pertencentes ao filo *Acidobacteria* seriam mais abundantes, enquanto em condições de alta disponibilidade de C, grupos de bactérias copiotróficas como *Proteobacteria* e *Bacteroidetes* apresentariam maior abundância relativa (FIERER; BRADFORD; JACKSON, 2007). Essa teoria responderia o predomínio de *Proteobacteria* nos solos das três áreas estudadas, com elevado conteúdo de material orgânico.

Semelhantemente, Smit et al. (2001) ao comparar seus resultados com dados de seqüência do gene rRNA 16S encontrados em literatura para cinco divisões bacterianas (*Acidobacterium*, *Proteobacteria*, *Nitrospira*, cianobactérias e bactérias verdes sulfurosas), avaliando a relação de abundância entre grupos específicos a diferentes condições de fertilidade do solo, encontraram para solos com alto teor de nutrientes uma seleção positiva de bactérias das divisões *Alfa* e *Betaproteobacteria*, indicativo de seleção do tipo *r*, ou seja, de bactérias com alta taxa de crescimento. Para solos com baixo teor de nutrientes, e alto teor de substratos recalitrantes, uma

maior porcentagem de bactérias pertencentes ao filo *Acidobacteria* foram encontradas, indicando uma seleção do tipo *k*, ou seja, por bactérias com baixo potencial de crescimento e alta capacidade de competição por substratos (SMIT et al., 2001). Os autores sugerem que as relações existentes nos solos entre grupos bacterianos de *Proteobacteria* e *Acidobacteria* poderiam indicar a condição nutricional destes solos, com valores baixos desta relação observados em solos oligotróficos, valores intermediários em solos agrícolas com baixo aporte de MOS e maiores valores em solos com maiores aportes de MOS (SMIT et al., 2001).

No presente estudo a classe *Alphaproteobacteria* foi a de maior predominância dentro do filo, representando aproximadamente 70, 54 e 74% do total das seqüências representativas do filo *Proteobacteria* nas áreas de FN, RF e RQ, respectivamente (Figura 15). Alguns estudos mostram o aumento da presença de indivíduos pertencentes a esta classe em solos sob cultivo devido a maior disponibilidade de nutrientes, o que estimularia o crescimento de populações de organismos estrategistas, como alguns membros pertencentes desta classe (PEREIRA et al., 2006; SMIT et al., 2001). No entanto, estudos em solos de ecossistemas naturais como os sistemas florestais, também evidenciam para o domínio da classe *Alphaproteobacteria* dentro do filo *Proteobacteria*, em suas seqüências afiliadas taxonomicamente (CHOW et al., 2002; FAORO, 2006; HACKL et al., 2004; KIM et al., 2007; NEUFELD; MOHN, 2005; PEREIRA, 2003; PEREIRA et al., 2006; SILVEIRA et al., 2006).

A classe *Alphaproteobacteria* compreende a maioria das bactérias púrpuras não-sulfurosas e organismos não-fotossintéticos com metabolismo diverso, sendo que as radiações dentro da classe são geralmente correlacionadas com propriedades fenotípicas, destacando-se os grupos das nitrificantes (*Nitrobacter* spp.) e denitrificantes (*Rhodopseudomonas* spp.), organismos com capacidade de fixação de nitrogênio (gêneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* e outros), parasitas intracelulares de células eucarióticas (gêneros *Bartonella* e *Rochalimaea*) (CANHOS et al., 1997). Organismos formadores de prosteca, como *Caulobacter* e *Prosthecomicrobium*, também são alocados nesta classe (CANHOS et al., 1997).

Das seis ordens pertencentes à classe *Alphaproteobacteria* foram detectadas no presente estudo, representantes de: *Caulobacterales*, *Rhizobiales*, *Rhodospirillales* e *Rickettsiales*, sendo as ordens *Caulobacterales* e *Rickettsiales* as de menor freqüência, apenas classificadas em seqüências pertencentes à área FN (Tabela 8). A ordem *Caulobacterales* foi classificada em duas seqüências presentes na área de FN, ambas pertencentes à família *Caulobacteraceae*, sendo uma

delas classificada quanto ao gênero *Caulobacter* (Tabela 8). A ordem *Caulobacterales* tem sido dividida em três clades: as famílias *Caulobacteraceae*, *Hyphomonadaceae* e *Rhodobacteriaceae* (HENRICI; JOHNSON, 1935). A baixa frequência de ocorrência de organismos pertencentes a esta ordem em estudos que envolvam diferentes ecossistemas ambientais, não nos permite atribuir funções específicas a estes organismos. Considerado um grupo taxonômico ainda pouco consolidado representado por bactérias endosimbiontes (GARRITY; HOLT, 2001), a ordem *Rickettsiales* foi classificada em apenas uma seqüência na área de FN, pertencente à família *Incertae sedis* 4, classificada quanto ao gênero *Odyssella* (Tabela 8).

Detectada nas três áreas amostradas, a ordem *Rhizobiales* foi à de maior frequência dentro de *Alphaproteobacteria*, representada por três famílias (*Beijerinckiaceae*, *Bradyrhizobiaceae* e *Hyphomicrobiaceae*) com quatro gêneros classificados (*Methylocapsa*, *Methylocella*, *Bradyrhizobium* e *Rhodoplanes*) (Tabela 8). As *Rhizobiales* incluem membros com uma grande variedade de características morfológicas, fisiológicas e biológicas distribuídas em onze famílias (GARRITY; BELL; LILBURN, 2004), a qual inclui grupos de microrganismos envolvidos com o ciclo do N (LEE et al., 2005). A família *Beijerinckiaceae* foi detectada nas três áreas estudadas, tendo algumas seqüências classificadas quanto a organismos metanotróficos acidófilos pertencentes aos gêneros *Methylocapsa* (detectado apenas na área de FN) e *Methylocella* (detectado nas áreas RF e RQ) (Tabela 8). Estudos recentes de genes que codificam para a subunidade alfa da enzima particulada metano mono-oxigenase (pMMO) relacionada estruturalmente e evolucionariamente a enzima nitrificadora de amônia mono-oxigenase (AMO), como o *pmoA* em solos de florestas, indicam a presença de metanotróficos putativos de *Alphaproteobacteria* os quais são filogeneticamente e fisiologicamente relacionados à metanotróficos acidófilos da família *Beijerinckiaceae* (KOLB et al., 2005). O presente trabalho corrobora com estudos prévios que sugerem uma alta afinidade de metanotróficos responsáveis pela oxidação de metano atmosférico em solos de florestas ácidas, os quais constituem somente uma pequena porção do total da comunidade microbiana devido deduzir baixa biomassa derivada de baixos níveis de metano atmosférico (HENCKEL et al., 2000).

Em ecossistemas naturais a fixação biológica do nitrogênio realizada por bactérias diazotróficas apresenta grande importância, podendo estar relacionada à manutenção da sustentabilidade de ecossistemas florestais (FRANCO; FARIA, 1997; ZAHRAN, 2001). A família *Bradyrhizobiaceae* é um exemplo de organismos diazotróficos constituído por bactérias

nodulantes extremamente heterogêneas, dentro das quais relações taxonômicas ainda não são bem definidas (GARRITY; HOLT, 2001). A família *Bradyrhizobiaceae* é formada por três gêneros: *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium* e *Phyllobacterium*, sendo apenas classificados no presente estudo organismos pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*, presente nas três áreas estudadas (Tabela 8). O gênero simbiótico *Bradyrhizobium* tem sido isolado de nódulos de plantas leguminosas altamente divergentes, tanto de espécies herbáceas quanto madeireiras, de origem tropical e temperada, incluindo espécies de leguminosas aquáticas como *Aeschynomene*, e não-leguminosas *Parasponia andersonii* (SPRENT, 2001). *Bradyrhizobium* tem sido encontrado como endofítico de inúmeras espécies de arroz (CHAINTREUIL et al., 2000; TAN et al., 2001). Provavelmente o aspecto mais contrastante da ecologia evolutiva de *Bradyrhizobium* é a capacidade de microrganismos pertencentes a este gênero migrarem por estilos de vida altamente contrastantes como: membros bacterianos de comunidades aquáticas e do solo, bactérias endofíticas ou rizosférica, ou como endosimbiontes fixadores de N₂ de diversas espécies de leguminosas hospedeiras. Bradyrhizobia são metabolicamente diversos, sendo algumas estirpes capazes de realizar desnitrificação ou estímulo à atividade da nitrogenase através de condições microaeróbias de vida livre; sendo outras capazes de degradar fotossinteticamente xenobióticos como 2,4-diclorofenoxiacetato (2,4-D) ou halobenzoatos (CHAINTREUIL et al., 2000; KITAGAWA et al., 2002; KURZ; LaRUE, 1975; MESA et al., 2002; SAITO et al., 1998; SO; LADHA; YOUNG, 1994). A família *Hyphomicrobiaceae* foi encontrada nos solos das três áreas estudadas, apresentando uma maior abundância relativa de clones seqüenciados nas áreas de FN e RQ, respectivamente (Tabela 8). Dentro desta família apenas o gênero *Rhodoplanes* foi identificado (Tabela 8) e constituiu-se de bactérias não-sulfurosas púrpuras fototróficas envolvidas em processos de desnitrificação (HIRASHI; UEDA, 1994).

A ordem *Rhodospirillales* foi detectada nas três áreas estudadas, sendo apenas uma família e dois gêneros classificados (gêneros *Acidisphaera* e *Stella*, família *Acetobacteraceae*) (Tabela 8). A ordem *Rhodospirillales* é formada por organismos acidófilos heterotróficos, cuja diversidade e distribuição nos solos é ainda desconhecida (HAMAMURA et al., 2005). Membros pertencentes ao gênero *Acidisphaera* estão envolvidos em processos de degradação de hidrocarbonetos aromáticos nos solos (HAMAMURA et al., 2005).

Seqüências classificadas na classe *Betaproteobacteria* foram detectadas no solo das três áreas estudadas, com apenas uma ordem das seis pertencentes à *Betaproteobacteria*

(*Burkholderiales*) classificada nos clones de seqüências do gene rRNA 16S (Tabela 8). As áreas RF e FN, respectivamente, tiveram o maior número de seqüências classificadas como *Burkholderiales*, sendo a maioria delas classificadas apenas ao nível de família (Tabela 8). Gêneros como *Burkholderia* (família *Burkholderiaceae*) e *Herbaspirillum* (família *Oxalobacteraceae*) foram detectados nas áreas, sendo o primeiro classificado em seqüências das três áreas; enquanto o segundo apenas na área RF (Tabela 8). Espécies pertencentes à ordem *Burkholderiales* são habitantes comuns da rizosfera caracterizadas pela sua versatilidade nutricional. Como atributos benéficos de alguns membros pertencentes a este grupo incluem a fixação de nitrogênio, promoção de crescimento de plantas e controle biológico de doenças (PARKE; GURIAN-SHERMAN, 2001). Gêneros como *Burkholderia*, *Herbaspirillum* e *Rhizobium* apresentam um importante papel no desenvolvimento das plantas através da produção de promotores de crescimento e fixação de nitrogênio (VESSEY; FEY, 2003). A alta representatividade dentro da biblioteca de clones do gene rRNA 16S para as ordens *Rhizobiales*, principalmente nas áreas de FN e RQ e, *Burkholderiales* nas áreas RF e FN, pode indicar um importante papel funcional destes organismos na ecologia de solos de florestas com araucária, sob diferentes condições de conservação.

As classes *Deltaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria* foram menos freqüentes nos solos das três áreas (Tabela 8). Membros da classe *Deltaproteobacteria* estão envolvidos em processos de redução dissimilatória do sulfato, redução de ferro, metabolismo fermentativo, comportamento predatório e desenvolvimento de ciclos de vida (CUMMINGS et al., 2003; DHILLON et al., 2003; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2003; RENDULIC et al., 2004). A grande diversidade metabólica da classe *Deltaproteobacteria* deixa aberto o potencial para muitos papéis ecológicos destes organismos nos solos. Dentre as sete ordens pertencentes a este filo apenas *Myxococcales* foi detectada no solo das áreas estudadas (Tabela 8). Uma seqüência detectada na área FN foi classificada como o gênero *Chondromyces* (família *Polyangliaceae*), importante pela capacidade de produção de metabólitos secundários, incluindo antibióticos (JANSSEN et al., 2002). A classe *Gammaproteobacteria* está distribuída em treze ordens (GARRITY; HOLT, 2001), sendo apenas três detectadas neste trabalho (*Enterobacteriales*, *Pseudomonadales* e *Xanthomonadales*) (Tabela 8). A ordem *Enterobacteriales* é representada por bactérias patogênicas e simbióticas (CLEVELAND et al., 2007) distribuídas em inúmeros ambientes, sendo muitos membros desta ordem identificados como potenciais solubilizadores de

fosfato, capazes de acessar cálcio e minerais fosfatados colapsados entre óxidos de ferro e alumínio (CHUNG et al., 2005; RODRÍGUES; FRAGA, 1999; SOUCHIE et al., 2006). Alguns trabalhos indicam que a decomposição do carbono solúvel do solo é fortemente limitada pela disponibilidade de P (CLEVELAND; TOWNSEND; SCHMIDT, 2002; CLEVELAND; TOWNSEND, 2006). Desta maneira, a habilidade de solubilizar o P poderia proporcionar uma vantagem competitiva a microrganismos pertencente à ordem *Enterobacteriales* em solos pobres em P, permitindo um rápido crescimento quando de entradas de C no solo (CLEVELAND et al., 2007). O gênero *Pseudomonas* (família *Pseudomonadaceae*, ordem *Pseudomonadales*), considerado um dos mais complexos e ubíquos grupos de bactérias Gram-negativas, apresentando similaridade fenotípica com muitos outros gêneros bacterianos (SPIERS; BUCKLING; RAINEY, 2000), foi detectado nas três áreas estudadas, porém em baixa frequência (Tabela 8). Semelhantemente, os gêneros *Frauteria* e *Nevskia*, ambos pertencentes à família *Xanthomonadaceae* (ordem *Xanthomonadales*) foram detectados em baixa frequência sendo classificados apenas na área FN (Tabela 8). Semelhantemente ao nosso estudo, o gênero *Frauteria* tem sido detectado em solos de sistemas florestais relacionado as baixas condições de pH encontradas nestes sistemas (CURTIS; NAKATSU; KONOPKA, 2002). As bactérias pertencentes a este grupo não obrigatoriamente seriam acidófilas e sim acidúricas, apresentando um pH ótimo de crescimento próximo à neutralidade, porém capazes de se adaptarem e sobreviver em condições ácidas de solo.

2.3.5.2 Estimativas de riqueza e índices de diversidade do solo

Na Tabela 9 são apresentados os índices de diversidade (Shannon e Simpson) e estimativa de cobertura de amostragem (ACE e Chao1), considerando-se a distância evolutiva de 0,03 para a definição das unidades taxonômicas operacionais (UTOs). A riqueza de de UTOs ($D = 0,03$) estimada nas áreas FN, RF e RQ foi de 89, 102 e 127, respectivamente. Essas UTOs representaram 75,42% do total de 118 seqüências avaliadas na área de FN, 71,33% do total de 143 seqüências avaliadas na área de RF, e 70,55% do total de 180 seqüências avaliadas na área de RQ (Tabela 9). Os dados mostraram que a riqueza de UTOs não foi estatisticamente diferentes nas três áreas avaliadas (confidência de 95%) (Tabela 9).

Métodos não-paramétricos permitem a identificação da verdadeira riqueza de UTOs, levando em consideração a estrutura das populações de organismos encontrada em cada amostra como representativo do valor máximo verdadeiro a qualquer nível filogenético (ROESCH et al., 2007). Os cálculos da estimativa de riqueza de espécies (UTOs) pelos métodos não-paramétricos de ACE e Chao1, mostraram que não houve diferença significativa entre as áreas de FN, RF e RQ, considerando a elevada amplitude encontrada nas áreas para o intervalo de confiança adotado (95% de probabilidade) (Tabela 9).

Estimativas de riqueza baseadas em Chao1 utilizam o número de espécies que ocorrem uma ou poucas vezes, para estimar o número de espécies desconhecidas. A informação de espécies desconhecidas é principalmente concentrada em espécies de baixa frequência (CHAO, 1984; SHEN; CHAO; LIN, 2003; CHAO; SHEN; HWANG, 2006). Enquanto o estimador baseado na cobertura de abundância (ACE), separa as espécies observadas em grupos de espécies raras e abundantes, e somente utiliza o grupo de espécies raras para estimar o número de espécies desconhecidas (CHAO; LEE, 1992; CHAO; MA; YANG, 1993).

O número de espécies detectadas em uma amostra, ou o número de organismos identificados dentro de um dado nível taxonômico, é fortemente afetado pelo número de seqüências analisadas (JANSEN, 2006; SCHLOSS; HANDELSMAN, 2006). A utilização de bibliotecas de clones de rRNA pode não representar totalmente as comunidades microbianas dos solos. Isso ocorre devido a limitações inerentes à técnica, que incluem a variabilidade genética do fragmento analisado e a amplificação preferencial de rDNA de grupos dominantes através da PCR (CURY, 2006). Ainda, estimativas de riqueza de espécies bacterianas em solos apontam para uma diversidade elevada, aumentando a necessidade de um maior esforço amostral para uma completa caracterização desta diversidade (CURTIS; SLOAN; SCANNELL, 2002; ROESCH et al., 2007; TORSVIK; GOKSØYR; DAAE, 1990).

Tabela 9 – Estimativas de riqueza de UTOS, índices de diversidade e cobertura de amostragem calculados a partir de bibliotecas do gene rRNA 16S de *Bacteria* de áreas de floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima acidental (RQ), no PECJ

Comunidade	NS ^a	NU ^b	Estimativa de Riqueza de UTOS		Índices de Diversidade		ECA ^e
			ACE	Chao1	Shannon ^c	1/D ^d	
D = 0,03							
FN	118	89	270 (184; 436)	248 (169; 405)	4,38 (4,28; 4,47)	68,3 (56,6; 86,1)	0,42
RF	143	102	299 (211; 459)	246 (179; 374)	4,48 (4,38; 4,58)	72,6 (59,7; 91,4)	0,47
RQ	180	127	450 (315; 682)	341 (247; 509)	4,67 (4,57; 4,77)	82,2 (67,0; 106,4)	0,46
TA ^f	441	284	906 (713; 1188)	819 (639; 1090)	5,40 (5,32; 5,48)	149,5 (117,9; 204,5)	0,52

^aNúmero de seqüências. ^bNúmero de UTOS determinado pelo DOTUR. ^cEstimador de máxima semelhança. ^dRecíproca do índice de Simpson (estimador de máxima semelhança). ^eEstimativa de cobertura de amostragem. ^fTodas as seqüências de solos de florestas com araucária. Valores entre parênteses representam o intervalo com 95% de confiança

Desta maneira, o seqüenciamento de menos de 400 clones pode representar uma amostragem incompleta (JANSEN, 2006), principalmente em sistemas ambientais complexos. Roesch et al. (2007), ao utilizarem o piroseqüenciamento do DNA e técnicas estatísticas para avaliar a diversidade bacteriana de quatro solos coletados através de um grande transecto entre a América do Norte e do Sul (solos agrícolas e florestais de regiões como o Canadá, Flórida, Ilinóis e Brasil), representada por cerca de 26.000 a 53.000 seqüências obtidas em cada área, encontraram alta diversidade bacteriana, principalmente nos solos florestais, com estimativa de riqueza, através de métodos não-paramétricos, de cerca de 52.000 UTOs, a um baixo nível de dissimilaridade.

Outras medidas quantitativas de diversidade comumente utilizadas em estudos ecológicos também foram utilizadas para o presente estudo e incluem: a recíproca do índice de Simpson e o índice de Shannon, os quais empregam independentes aproximações matemáticas para medida de diversidade. A recíproca do índice de Simpson revelou o mesmo fenômeno encontrado para outras estimativas de riqueza utilizadas neste estudo, não havendo diferença significativa quanto à diversidade bacteriana encontrada nas três áreas estudadas (Tabela 9). Para o índice de Shannon os dados mostram uma maior diversidade na área RQ (4,67), sendo estatisticamente diferente da área FN (4,38) (Tabela 9). As áreas FN e RF não diferiram entre si, da mesma maneira que RQ não diferiu estatisticamente da área RF, considerando o intervalo de confiança (Tabela 9).

Embora os índices de diversidade sejam medidas quantitativas da maior ou menor diversidade encontrada nas amostras e/ou áreas, a interpretação do seu resultado pode ser diferenciada. O índice de diversidade de Shannon considera a riqueza ou o número de diferentes espécies encontradas nas diferentes áreas, considerando ainda, a equitabilidade ou igualdade da distribuição de indivíduos destas espécies, o que o torna uma boa medida representativa da diversidade de um solo (MAGURRAN, 1988; ODUM, 1983; PINTO-COELHO, 2000). Desta maneira, o índice evidencia o peso das espécies raras ou de baixa freqüência encontradas em cada área. Espécies não dominantes e espécies raras podem em alguns casos, exercer uma força controladora no ecossistema, com papéis chaves na funcionalidade do mesmo (PINTO-COELHO, 2000). Para o índice de Simpson, o cálculo dá maior peso as espécies mais abundantes, e a adição das espécies raras praticamente não causa mudanças significativas no valor encontrado para o mesmo (MARGURRAN, 1988; ODUM, 1983; PINTO-COELHO, 2000).

A estimativa de cobertura de amostragem das bibliotecas estimadas pelo SPADE foi de 42, 47 e 46% para as áreas de FN, RF e RQ, respectivamente ($D = 0,03$). A Figura 14 mostra o número de filotipos estimados pelo algoritmo Chao1 a diferentes distâncias evolutivas. Os dados indicam que a estimativa de riqueza de UTOs estimada pelo Chao1 para as áreas FN, RF e RQ não é significativamente diferente a uma distância evolutiva de 0,03 (Figura 14). No entanto, a riqueza de UTOs foi significativamente menor na área RF quando comparada às áreas FN e RQ para $D \geq 0,1$ (Figura 14). Comparada à riqueza de UTOs da área FN, as áreas RF e RQ apresentaram menor riqueza para $D \geq 0,3$ (Figura 14).

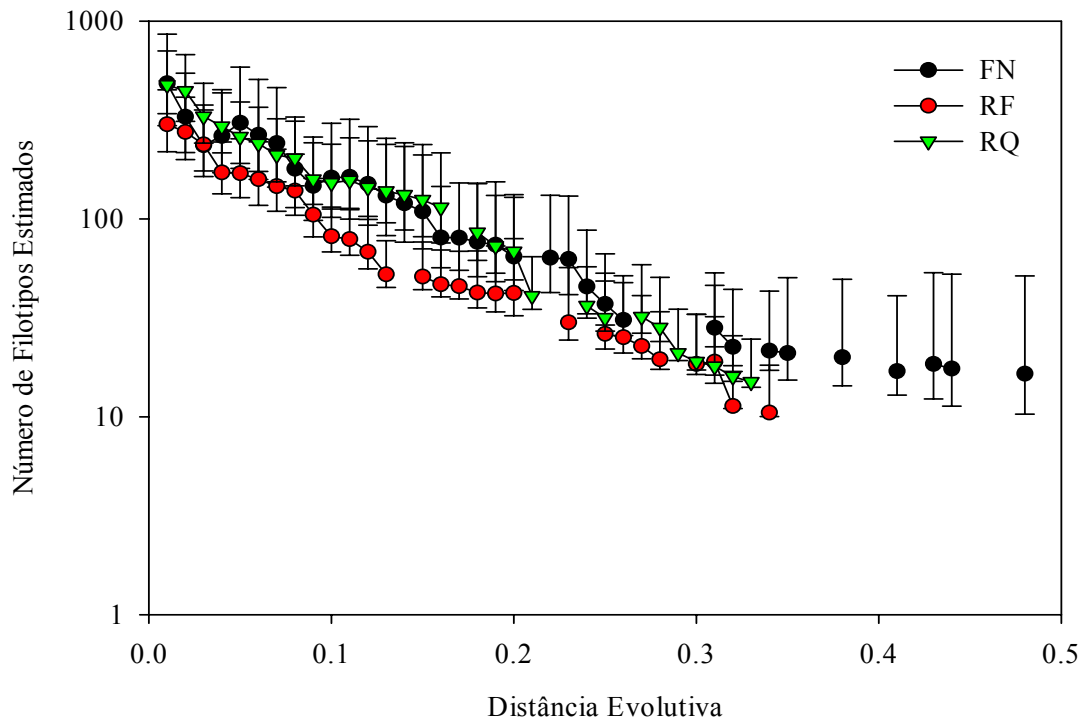


Figura 14 – Número de filotipos de *Bacteria* estimado para diferentes distâncias evolutivas em solos de áreas de floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima acidental (RQ), no PECJ, utilizando-se o estimador não paramétrico Chao1. As barras representam o intervalo de confiança (95% de probabilidade)

Muito embora as estimativas de diversidade tenham mostrado que não há diferença significativa entre as áreas, as comparações das bibliotecas do gene rRNA 16S usando o programa S-LIBSHUFF, mostram que as comunidades de *Bacteria* das três áreas estudadas são estatisticamente diferentes entre si ($P \leq 0,001$; Tabela 10).

Tabela 10 – Valores de p calculado nas comparações múltiplas entre as bibliotecas do gene rRNA 16S das comunidades de *Bacteria* usando o S-LIBSHUFF

X	Y		
	FN	RF	RQ
FN	-	0,0286	0,0401
RF	0,0001**	-	0,0003**
RQ	0,0016**	0,0093	-

FN: Floresta nativa com predomínio de araucária; RF: Reflorestamento de araucária; RQ: Reflorestamento de araucária com queima accidental. X homólogo na coluna e Y homólogo na linha. Valores mínimos para diferença significativa: 0,0017 e 0.0085 para 1 e 5% de probabilidade, respectivamente.

*Diferença significativa ($P \leq 0,05$), **Diferença significativa ($P \leq 0,001$)

As diferenças na composição das comunidades reveladas pela análise do S-LIBSHUFF confirmam os dados obtidos pela análise filogenética baseada nos dados de seqüenciamento (Tabela 8, item 2.3.5.1), bem como a diferença significativa encontrada nas três áreas para a estrutura das comunidades analisadas via DGGE, identificada pela análise multivariada (NMDS) associada ao teste ANOSIM (Tabela 7, item 2.3.4), e revelam complexas estruturas de comunidades bacterianas encontradas nas três áreas. Essa complexidade pode ser visualizada através da Figura 15.

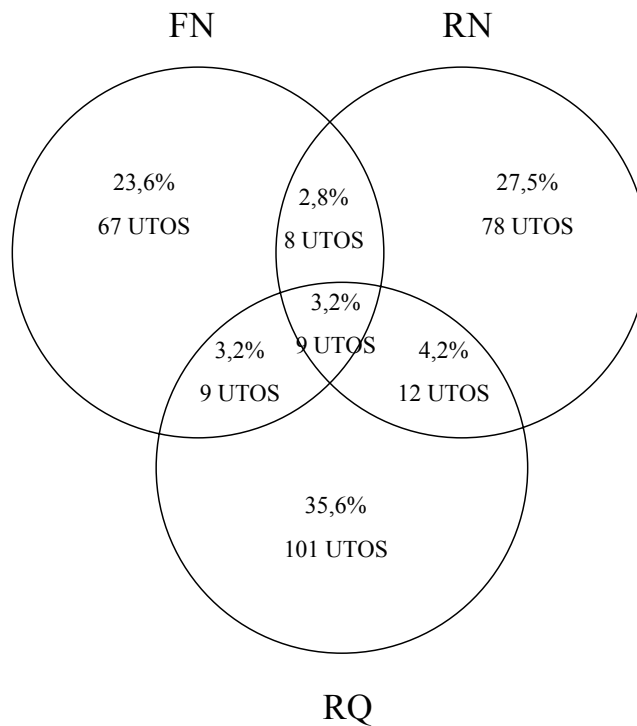


Figura 15 – Diagrama de Ven representado a frequência relativa das diferentes UTOS identificadas pelo DOTUR em áreas de floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima accidental (RQ), no PECJ

Do total de 441 seqüências analisadas, 284 UTOs foram estimadas através do DOTUR (Tabela 9). Destas, 214 UTOs representam seqüências presentes somente em uma das três áreas (FN, RF e RQ), enquanto 70 UTOs foram detectadas em mais de uma área (Figura 15; Anexo 1). Das UTOs específicas de cada área, 67 delas estão presentes na área FN, representando 23,6% do total, enquanto os tratamentos RF e RQ apresentam, respectivamente, 78 e 101 UTOs (27,5 e 35,6% do total de UTOs) (Figura 15; Anexo 1). Apenas 3,2% do total de UTOs foram detectadas nas três áreas. Aproximadamente 2,8% do total de UTOs foram detectadas nas áreas FN e RF, e 3,2% detectadas nas áreas FN e RQ (Figura 15; Anexo 1). Nas áreas RF e RQ, 4,2% do total de UTOs foram detectadas em ambas as áreas (Figura 15; Anexo 1).

Para representar o comportamento da distribuição das diferentes UTOs em um espaço de ordenação reduzido e comparar a correspondência entre as áreas e UTOs, uma análise de correspondência (AC) foi realizada a partir da tabela de freqüência de UTOs gerada pelo DOTUR (Figura 16). A análise de correspondência tem sido geralmente utilizada em estudos ecológicos para determinar se padrões na distribuição de UTOs podem refletir diferenciação da composição da comunidade como uma função de sazonalidade, origem geográfica, ou estrutura de habitat (EDWARDS et al., 2006; KENT et al., 2007; OLAPADE; GAO; LEFF, 2005).

A dimensão 1 da AC explicou 51,1% da variabilidade total dos dados, enquanto o eixo dois explicou 49,9% da variabilidade restante dos dados (Figura 16). Ao longo da dimensão 1 (eixo principal 1), a área de FN está disposta na porção mediana superior, enquanto as áreas de RF e RQ estão dispostas na porção inferior à extrema esquerda (para RF), e a extrema direita (para RQ) mostrando haver uma boa separação entre as áreas estudadas (Figura 16). A análise ainda nos permite visualizar a maior ou menor associação de cada UTO com cada área amostrada, por meio da proximidade entre as variáveis (UTOs e áreas). Quanto mais próximas as variáveis, mais freqüente é a sua ocorrência conjunta. Desta maneira, as áreas FN e RF tiveram um maior número de UTOs associadas a elas (Figura 16). As UTOs 3, 4, 6 e os demais representados no gráfico, que representam espécies pertencentes a família *Acetobacteraceae* (gênero ND), gêneros *Acidobacterium* e *Burkholderia*, respectivamente (Tabela 11), apresentam maior freqüência de ocorrência conjunta e estão fortemente associadas com a área FN (Figura 16). Da mesma maneira, as UTOs 184 a 284 estão fortemente associados a área RQ, enquanto as UTOs 95 a 111, e demais representados no gráfico, estão associadas a área RF (Figura 16). UTOs

dispostos na porção mediana da Figura 16, não se associam especificamente a nenhuma das áreas com araucária e apresentam pouca contribuição para a variabilidade total.

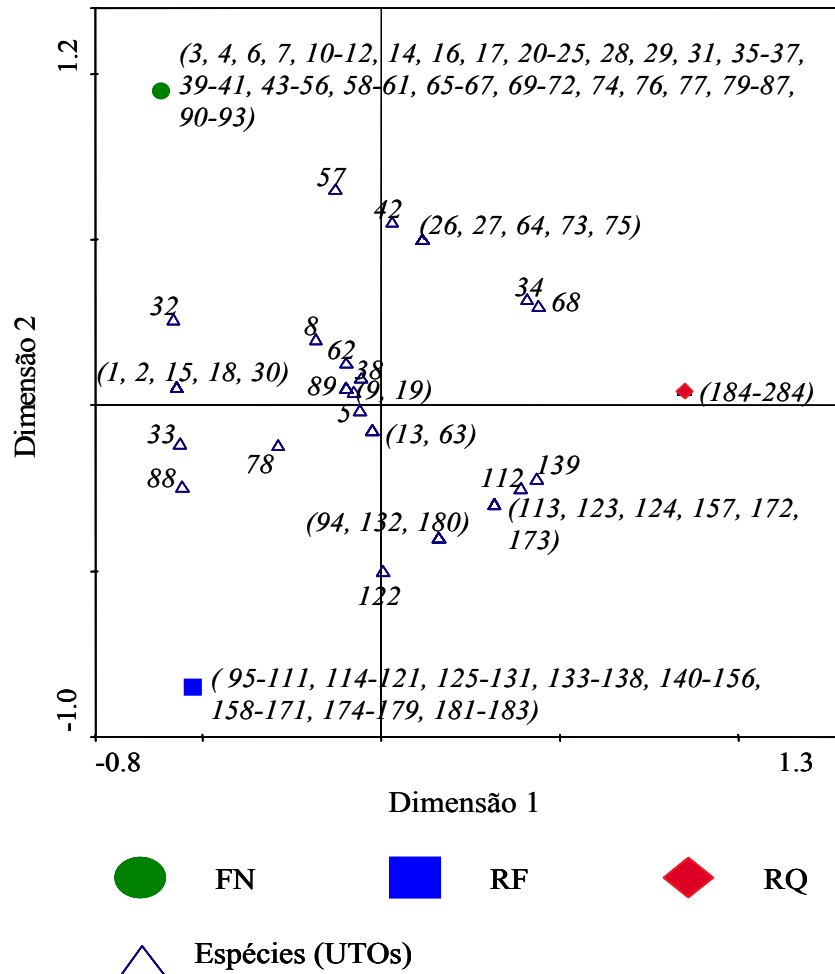


Figura 16 – Relação entre os eixos 1 e 2 da análise de correspondência (AC), discriminando as áreas de floresta nativa com predominio de araucária (FN), reforestamento de araucária (RF) e reforestamento de araucária com queima acidental (RQ), no PECJ, e as UTOs, estimadas pelo DOTUR

Das UTOs fortemente associadas com a área FN a grande maioria caracteriza-se por bactérias ainda desconhecidas, não podendo ser classificadas em táxons maiores, e bactérias pertencentes aos fillos *Proteobacteria* e *Acidobacteria* (Tabela 11). As demais UTOs associadas a área FN caracterizam-se por bactérias pertencentes a quase todos os fillos detectados no estudo, com exceção do fillo *Cyanobacteria*, sendo algumas UTOs classificadas a nível de classe, ordem, família e gênero (Tabela 11). Para RQ, a associação entre as UTOs mostrou o maior número de

bactérias desconhecidas relacionadas a área, seguida de UTOs representativas dos filos *Proteobacteria* e *Acidobacteria*, assim como FN, e representantes dos demais filos, com exceção de *Cyanobacteria* e *Verrucomicrobia* (Tabela 11). A área FN teve forte associação entre UTOS representativas de bactérias desconhecidas e bactérias pertencentes ao filo *Acidobacteria* (Tabela 11). A descrição do papel ecológico e funcional dos diferentes filos e outros táxons pode ser visto no item 2.3.5.1.

Tabela 11 – Distribuição dos 284 UTOs em diferentes táxons de *Bacteria*. UTOs estimadas pelo DOTUR para as seqüências das áreas de floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima acidental (RQ), no PECJ

(continua)

Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	UTO
ND*	ND	ND	ND	ND	11, 12, 13, 22, 25, 43, 45, 48, 52, 53, 56, 66, 69, 70, 72, 73, 83, 97, 100, 102, 106, 108, 109, 111, 117, 120, 122, 125, 128, 130, 132, 134, 135, 137, 140, 143, 145, 147, 148, 149, 154, 156, 161, 163, 168, 170, 172, 175, 178, 180, 183, 185, 187, 189, 191, 194, 195, 201, 203, 220, 205, 206, 207, 210, 217, 226, 229, 234, 238, 239, 255, 259, 262, 263, 269, 271, 275, 281, 284
Acidobacteria	ND	ND	ND	ND	118, 165
Acidobacteria	Acidobacteria	ND	ND	ND	119, 146, 150, 152, 166, 227, 230, 253, 264, 280
Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	ND	ND	86, 260, 273, 282
Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	ND	71, 138, 240
Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Acidobacterium	2, 4, 15, 16, 17, 24, 18, 28, 34, 47, 57, 60, 65, 78, 88, 90, 93, 94, 96, 99, 103, 104, 107, 112, 129, 131, 151, 153, 157, 159, 174, 176, 182, 186, 196, 198, 218, 231, 243, 251, 256, 274
Actinobacteria	Actinobacteria	ND	ND	ND	14, 50, 177, 184, 265
Actinobacteria	Actinobacteria	Acidimicrobiales	Acidimicrobiaceae	Acidimicrobium	81
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	ND	ND	29, 39, 116, 211, 224, 225
Bacteroidetes	ND	ND	ND	ND	37, 114, 223
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	ND	ND	31, 58, 91, 167
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	ND	85

Tabela 11 – Distribuição dos 284 UTOs em diferentes táxons de *Bacteria*. UTOs estimadas pelo DOTUR para as seqüências das áreas de floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima acidental (RQ), no PECJ

(continuação)

Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	UTO
Cyanobacteria	Cyanobacteria	ND	ND	ND	30
Firmicutes	ND	ND	ND	ND	76, 279
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	155
Firmicutes	Clostridia	ND	ND	ND	124, 277
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	Gemmatimonadaceae	ND	55
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	Gemmatimonadaceae	Gemmatimonas	42, 202, 209, 244
Planctomycetes	Planctomycetacia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	ND	7
Proteobacteria	ND	ND	ND	ND	9, 26, 61, 84, 110, 162, 219, 248, 257, 266, 278
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	ND	ND	ND	21, 35, 77, 80, 136, 160, 205, 208, 213, 245, 247, 267
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	ND	59
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	Caulobacter	79
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	ND	ND	41, 44, 49, 75, 92, 98, 101, 123, 127, 171, 181, 190, 197, 204, 212, 215, 221, 222, 241, 249, 254, 268, 276
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	ND	23
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	Methylocapsa	19
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	Methylocella	113
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	ND	51, 141, 193, 236
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	Bradyrhizobium	1, 38, 89, 214, 233
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	ND	139, 200, 232, 250, 258

Tabela 11 – Distribuição dos 284 UTOs em diferentes táxons de *Bacteria*. UTOs estimadas pelo DOTUR para as seqüências das áreas de floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima acidental (RQ), no PECJ etembro/2004 (conclusão)

Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	UTO
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hypomicrobiaceae	Rhodoplanes	8, 62,63, 68, 173
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	ND	ND	40, 121, 164
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acetobacteraceae	ND	3, 74, 82, 272
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acetobacteraceae	Acidisphaera	192
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acetobacteraceae	Stella	64
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rickettsiales	Incertae sedis 4	Odysella	20
Proteobacteria	Betaproteobacteria	ND	ND	ND	144
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	ND	ND	33
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia	6, 27, 87, 142, 158, 246
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Incertae sedis 5	ND	270
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Herbaspirillum	133
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	ND	ND	ND	228, 261, 283
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Cystobacteraceae	ND	169, 216
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Polyangliaceae	ND	126
Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Polyangliaceae	Chondromyces	67
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	ND	ND	ND	5, 32, 95, 105, 115, 179, 188, 242
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	ND	199
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	36, 237
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	ND	252
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Frateuria	54
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Nevskia	46
Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	ND	ND	10

ND* – Não definida

2.3.6 Capacidade de utilização de substratos de carbono (Biolog)

A resposta das curvas de utilização de substratos de C (metabolismo heterotrófico médio - MHM) pela microbiota dos solos das diferentes áreas mostrou-se de forma tipicamente sigmoideal com uma fase lag, uma fase de crescimento exponencial e uma fase estacionária (Figura 17). A fase lag em todas as áreas (FN, RF e RQ) se concentrou nas primeiras 24 horas de incubação das microplacas, sendo a partir daí iniciada a fase exponencial de utilização dos substratos (Figura 17).

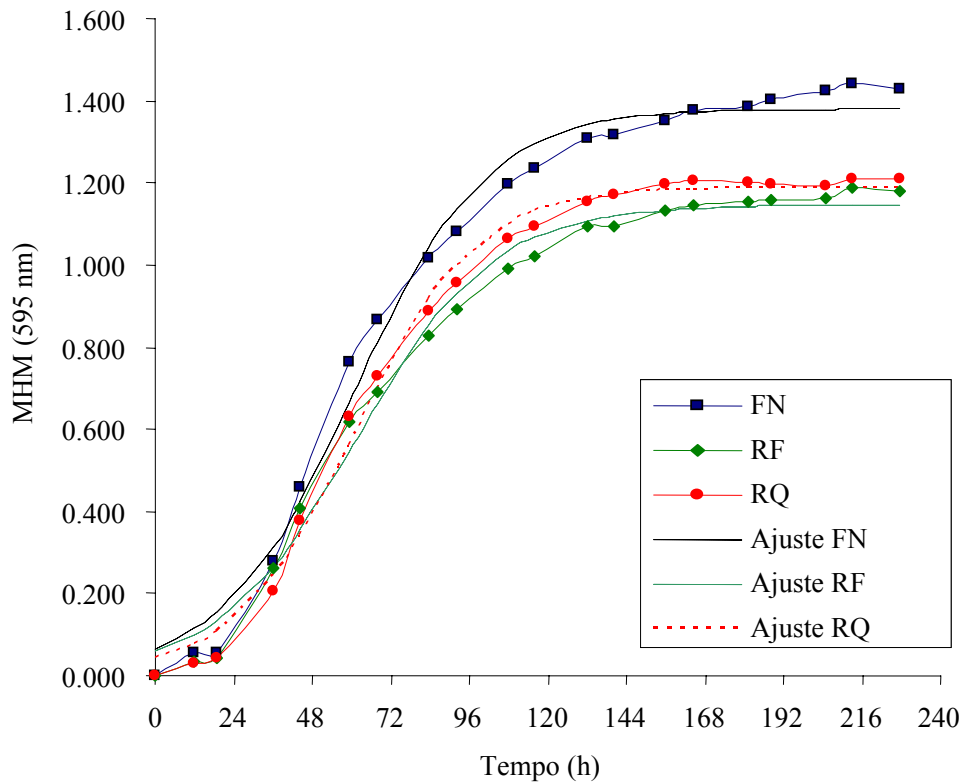


Figura 17 – Metabolismo heterotrófico médio (MHM) para as áreas de floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima acidental (RQ), no PECJ. O MHM é média da absorbância dos 95 substratos dos poços corrigida pela subtração da absorbância do poço referência a cada ponto no tempo. As linhas tracejadas (...) é a plotagem da equação de ajuste para a média dos dados de absorbância

A área FN apresentou os maiores valores para o MHM quando comparada às áreas RF e RQ, apresentando um incremento quanto ao seu MHM em relação às demais áreas, a partir de 48 horas de incubação (Figura 17). As áreas de RQ e RF não diferiram entre si quanto ao MHM, e

alcançaram a sua fase estacionária quanto ao consumo de substratos aproximadamente a 156 horas de incubação (Figura 17). Para a área FN a estabilização da utilização das diferentes fontes de C ocorreu aproximadamente a 204 horas de incubação (Figura 17).

Para o presente estudo, a minimização do efeito da densidade do inóculo na determinação da potencial de utilização das diferentes fontes de C em cada área, foi realizada pela contagem inicial de células em meio de cultivo, bem como a posterior normalização dos dados obtidos para o MHM, como sugerido por Garland (1997). Desta maneira os valores de MHM sugerem que as taxas de utilização de fontes de C observadas podem refletir no potencial fenotípico da comunidade (GARLAND, 1997); podendo ainda indicar uma maior capacidade funcional da comunidade microbiana da área FN, quando comparado às demais áreas. Mudanças nos perfis fenotípicos de uma comunidade podem estar relacionadas a forças seletivas não diretamente medidas através da técnica Biolog, sugerindo que a mudança em um perfil possa ser estruturalmente relevante, mas funcionalmente enganatória (GARLAND, 1997).

Análise cinética e técnicas multivariadas claramente incrementam a informação potencial que podem ser geradas através dos perfis fisiológicos, e condições de desenvolvimento adicional (GARLAND, 1997). O comportamento geral dos parâmetros do modelo cinético pode ser visto na plotagem do MHM com o passar do tempo, para as três áreas avaliadas (Figura 17). Cada ponto da Figura 17 representa a mudança da densidade óptica (DO) ao longo do tempo de 2850 pontos corrigidos para a amostra controle, de 10 placas (repetições) avaliadas em cada área. Diferenças significativas foram encontradas para os parâmetros cinéticos estimados nas áreas de FN, RF e RQ ($P < 0,05$).

Altos níveis de utilização dos substratos (valores de K) foram observados em todas as áreas (Figura 17), com o máximo consumo de substrato ocorrendo na área de FN (1,408) (Tabela 12). Os maiores valores encontrados para K em FN foram estatisticamente diferentes dos valores encontrados para o K da área de RF (1,152) (Tabela 12). A área de RQ apresentou o segundo maior valor para o K (1,190), porém não significativo aos valores encontrados nas áreas de FN e RF (Tabela 12).

As áreas FN e RQ tiveram um padrão similar em suas taxas de crescimento exponencial (R, 0,055 e 0,056 respectivamente), diferindo estatisticamente dos valores encontrados para a área RF (0,048) (Tabela 12). O maior tempo para alcançar o ponto médio da fase exponencial (S) de utilização dos substratos ocorreu na área RF (63,788), que foi significativamente diferente da

área FN (58,846) (Tabela 12). A área RQ não diferiu (63, 105; $P < 0,05$) das áreas FN e RF quanto ao valor de S (Tabela 12).

Tabela 12 – Parâmetros cinéticos (valores médios e desvio padrão, $n=10$) da curva de ajuste do metabolismo heterotrófico médio (MHM; K, R e S) para as áreas de floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima acidental (RQ), no PECJ

Áreas	K	R	S
FN	1,408 ± 0,18 a	0,055 ± 0,01 a	58,846 ± 4,35 b
RF	1,152 ± 0,26 b	0,048 ± 0,01 b	63,788 ± 7,87 a
RQ	1,190 ± 0,22 ab	0,056 ± 0,00 a	63,105 ± 5,59 ab

Médias seguidas da mesma letra minúsculas, nas colunas, não diferem entre si a 5% pelo teste LSD

A análise das relações entre parâmetros cinéticos e parâmetros químicos do solo avaliados nas áreas estudadas mostrou que apenas os valores de pH correlacionaram-se significativamente com a máxima utilização dos substratos (K) ($P < 0,05$), sendo esta correlação negativa (Tabela 13). Esses dados são corroborados por White et al. (2005), os quais identificaram o pH como sendo um importante fator que influencia o funcionamento de comunidades microbianas dos solos de florestas no Canadá, afetando diretamente na sua capacidade de utilização dos substratos.

Variações na diversidade microbiana dos solos relacionadas a diferenças no pH do solo também foram encontradas por Grayston et al. (2003). A acidez do solo leva a um decréscimo de C disponível para as comunidades microbianas (ANDERSON; DOMSCH, 1993; BÁÁTH et al., 1995) e taxas menores de crescimento microbiano (BÁÁTH, 1998). No entanto, estudos mostram que diferentes comunidades microbianas são adaptáveis a diferentes valores de pH (ANDERSSON; INGVAR-NILSSON, 2001; BÁÁTH, 1996).

Nossos dados mostram que os maiores valores de K, ou seja, a maior capacidade ou diversidade funcional das áreas estudadas está diretamente associada aos menores valores de pH encontrados nas áreas. Esses dados sugerem a adaptação das comunidades microbianas presentes nos solos destas áreas aos baixos valores de pH, o que pode ser visto através da afiliação filogenética bacteriana realizada através da análise de clones do gene rRNA 16S. A afiliação filogenética mostrou um predomínio de bactérias acidófilas pertencentes aos filós *Proteobacteria* e (Tabela 8; item 2.3.5.1). Comunidades bacterianas associadas a florestas coníferas podem conter maior proporção de bactérias Gram-positivas adaptadas ao ambiente acidificante; em contraste, incrementos no pH do solo podem resultar em maior proporção de bactérias Gram-

negativas (FROSTEGÅRD et al., 1993; PENNANEN, 2001). Diferenças na estrutura de comunidades relacionadas ao pH podem resultar em diferenças no perfil de utilização de substratos de C pelas comunidades microbianas (ANDERSON; JOERGENSEN, 1997).

Tabela 13 – Correlação de Pearson entre parâmetros cinéticos e parâmetros químicos do solo. Campos do Jordão

Áreas	pH CaCl ₂	H+Al	P	K	Ca	Mg	MO
K	-0,598*	0,175	0,265	0,351	0,210	0,265	0,150
R	-0,038	-0,003	0,238	0,189	0,089	0,074	0,093
S	0,219	0,025	-0,153	-0,048	-0,226	-0,140	0,015

Asteriscos indicam correlações significativas a 5%

Os resultados da análise de escala multidimensional (*Non-metric Multidimensional Scaling* - NMDS) baseada nos parâmetros cinéticos do MHM das três áreas são apresentados na Figura 18. A ANOSIM revelou diferença significativa (R global = 0,112; $P < 0,05$) e o resultado do teste *Pairwise* mostrou que a área FN foi significativamente diferente das áreas RF e RQ, as quais não diferiram entre si (Tabela 14).

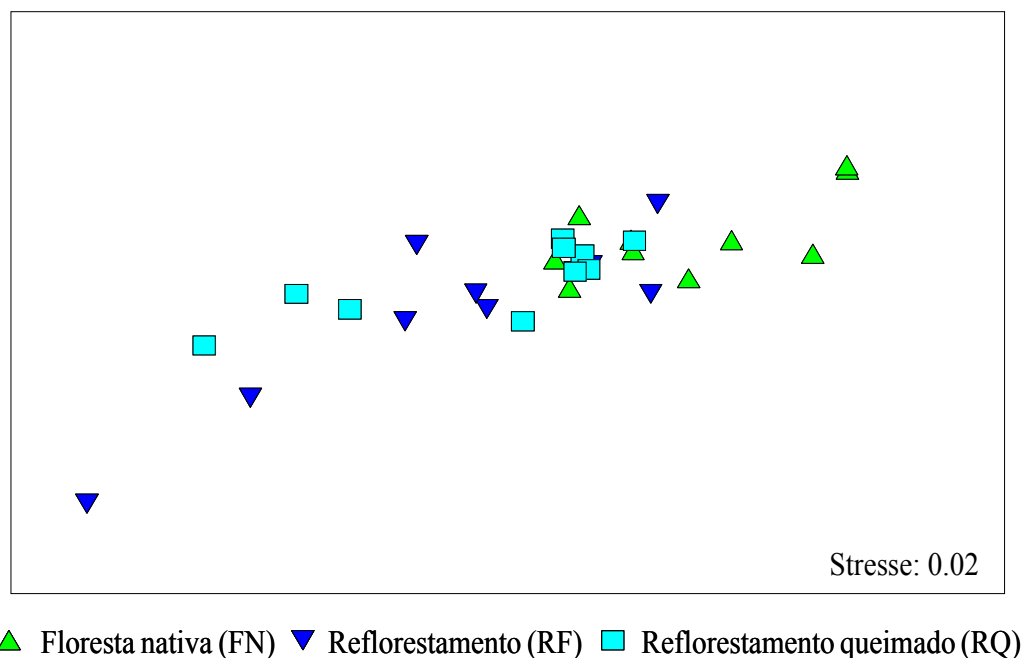


Figura 18 – Análise de escala multidimensional (NMDS) dos parâmetros cinéticos do MHM (K, R e S) das áreas de floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima acidental (RQ), no PECJ

Tabela 14 – Resultado do teste *Pairwise* (Estatística R) dos parâmetros cinéticos do MHM das áreas de floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima acidental (RQ), no PECJ. (* $P < 0,05$; ** $P < 0,001$)

Áreas	Estatística R
FN, RF	0,188**
FN, RQ	0,160*
RF, RQ	-0,010

Parâmetros cinéticos foram estimados e permitiram a discriminação das comunidades microbianas em inúmeros estudos, como os com solos contaminados (LINDSTRÖM; BARRY, BRADDOCK, 1998), compostagem (MONDINI; INSAM, 2003), florestas mediterrâneas (GOBERNA et al., 2005), uso da terra e forma de manejo dos Montados Portugueses (COSTA, 2006). Neste estudo, os parâmetros cinéticos permitiram a discriminação das diferentes áreas quanto ao seu potencial fisiológico, e complementou através do emprego da análise multivariada a resposta univariada obtida através dos índices de diversidade e testes de comparação de médias.

O parâmetro K representa uma estimativa da extensão do potencial máximo de utilização de um substrato para um particular inóculo (LINDSTRÖM; BARRY; BRADDOCK, 1998). Uma maior capacidade de utilização de diferentes fontes de substratos atribui uma maior diversidade funcional da comunidade microbiana do solo. No entanto, não reflete diretamente uma maior diversidade de organismos, uma vez que diferentes grupos podem utilizar o mesmo substrato, bem como ocorrer seleções de grupos específicos de microrganismos (PRESTON-MAFHAM et al., 2002; STEFANOWICZ, 2006); não permitindo uma real caracterização da diversidade fisiológica das comunidades microbianas do solo (STEFANOWICZ, 2006).

O método Biolog nem sempre apresenta eficiência na distinção de diferenças no potencial funcional da comunidade microbiana de diferentes tipos de solos. Para Waldrop, Balsler e Firestone (2000), o método Biolog não foi capaz de distinguir efeitos dos tratamentos no potencial funcional das comunidades microbianas de uma floresta tropical quando comparada à uma floresta tropical submetida ao manejo agrícola através do cultivo do abacaxi. Semelhantemente Priha et al. (2001), não distinguiram alterações nas comunidades microbianas medidas pelos seus perfis fisiológicos, quando comparadas diferentes espécies vegetais em áreas florestais. No entanto, Roger e Tate III (2001), encontraram diferenças significativas nos perfis fisiológicos das comunidades microbianas dos solos de diferentes florestas nativas nos Estados Unidos.

Os maiores níveis de utilização de fontes de C (K) foram observados na área FN, provavelmente estão associados, a qualidade do material orgânico encontrado na área. Essa hipótese também justificaria as diferenças significativas encontradas entre as áreas estudadas para os demais parâmetros microbiológicos mensurados no presente estudo, mesmo em outra época de coleta, e justificaria as diferenças encontradas principalmente entre as áreas de FN e RQ, que apresentaram características químicas similares. Uma maior densidade e diversidade de espécies vegetais contribuem para mudanças na qualidade do material orgânico no solo podendo refletir em mudanças na composição das comunidades microbianas (COSTA, 2006; INSAM et al., 1996; JOHNSON et al., 1998).

Um segundo componente determinado através da resposta fisiológica das comunidades microbianas medidas por placas Biolog seria a determinação de sua diversidade funcional pela capacidade de utilização de diferentes fontes de C. A riqueza de substratos de carbono (Ss) apresentou diferença significativa entre as áreas estudadas apenas no período de incubação de 120 e 168 horas, dada através dos seus desvios (Figura 19). O índice de diversidade de Shannon (H) reflete a riqueza de substratos e a intensidade com que esses substratos são utilizados pela microbiota (ZAK et al., 1994). O H teve seus maiores valores na área de RF, sendo estes significativos quanto aos valores encontrados em FN e RQ apenas nas primeiras 48 horas de incubação (dados não apresentados). Para os demais períodos as áreas apresentaram valores similares de H não diferindo significativamente entre si, dado os seus desvios em relação à média (dados não apresentados). O índice de diversidade médio (H) obtido nas três áreas ao longo de todo o período de incubação ficou em torno de 2,8 para as três áreas estudadas.

A equitabilidade de substratos (E) mede a uniformidade de utilização dos substratos consumidos pelas comunidades microbianas (MAGURRAN, 1988). As áreas estudadas apresentaram similares valores de equitabilidade ao longo do tempo não havendo diferenças significativas entre as áreas estudadas (dados não apresentados). Valores de E médio obtidos nas três áreas ao longo de todo o período de incubação mostrou que a área de FN apresentou menor uniformidade média de utilização dos substratos (0,99) quando comparada ao RF (1,09) e RQ (1,06). Dentre os índices avaliados, apenas a riqueza de substratos (Ss) revelou variações significativas na diversidade encontrada nas amostras avaliadas em cada área (Figura 19).

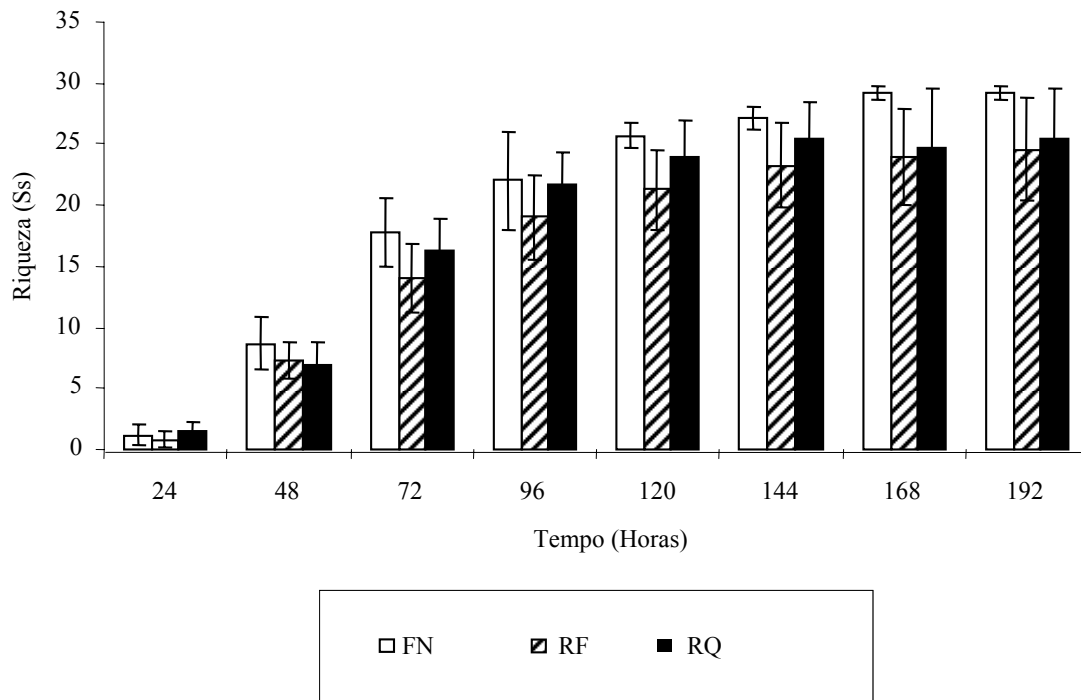


Figura 19 – Riqueza de substratos de carbono utilizados (Ss) com base na capacidade de utilização de substratos de C por microrganismos do solo de áreas de floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reforestamento de araucária (RF) e reforestamento de araucária com queima acidental (RQ), no PECJ. Os dados representam à média de 10 repetições. Barras representam desvios padrão da média

Desde que a diversidade é somente um aspecto do padrão de utilização de substratos de C, os índices univariados não capturam todo o potencial de diferença da técnica Biolog. Os valores encontrados para o H nas três áreas estudadas confirmam os valores encontrados em literatura para o H calculado de perfis fisiológicos para outros solos, que variam de 0,05 (deserto) até 4,32 (floresta de pinheiros), onde solos florestais em geral variam entre 2,65 e 4,32 (DERRY et al., 1999). Para as três áreas, a diversidade global foi alta com pequena variação entre FN, RF e RQ ao longo do tempo. Solos florestais são ricos em C e N orgânico e há a possibilidade que bactérias dominantes, sejam generalistas e capazes de utilizar diferentes fontes de C (LAVERMAN et al., 2005). Isso provavelmente justificaria a rápida taxa de crescimento nas primeiras 24 horas de inoculação para a área de RF. Mesmo com menor capacidade de utilização de diferentes fontes de C (Ss) nas primeiras horas de inoculação, a disponibilidade de nutrientes permitiria um crescimento rápido de uma população de oportunistas presentes em RF, hábeis a utilizar algumas fontes específicas de C.

Smalla et al. (1998), mostraram que os padrões de utilização de substratos de C envolve populações cultiváveis. A fração cultivável na microplaca pode ser relativamente maior devido a efeitos de cooperatividade entre organismos e a mensuração de certos organismos inábeis em crescer em meios sólidos (GARLAND, 1997). O enriquecimento de um limitado número de espécies capazes de utilizar os substratos de Biolog pode ter ocorrido nas três áreas. Conseqüentemente, as medidas de diversidade refletem parte da real diversidade funcional do solo das diferentes áreas.

Estudos envolvendo o uso de técnicas como PCR-DGGE para determinar a seletividade dos poços Biolog sem se basear em microrganismos cultiváveis (DiGIOVANNI et al., 1997) reportam que a diversidade de microrganismos que crescem com diferentes fontes de C é menor que a encontrada na amostra original, com diferentes seleções preferenciais em função do substrato de C. O perfil das comunidades bacterianas, revelado através do PCR-DGGE (Figuras 6 e 7; item 2.3.4) mostra maior variabilidade entre as áreas estudadas do que os perfis fisiológicos. Semelhantemente, Laverman et al. (2005) encontraram em solos de florestas ácidas na Holanda uma maior variação na estrutura genética total medida através do PCR-DGGE, contrastando com uma pequena variação na estrutura funcional das áreas.

2.3.6.1 Cinética dos diferentes grupos de substratos de carbono

A Tabela 15 apresenta os valores dos parâmetros cinéticos (K, R e S) estimados para os seguintes grupos de substratos: ácido carboxílico, aminas, aminoácidos, carboidratos, miscelânea e polímeros. Diferenças significativas quanto aos parâmetros estimados só foram encontradas para o grupo de carboidratos ($P < 0,05$).

Os maiores valores da taxa de utilização dos substratos (K) obtidos para o grupo de carboidratos foram encontrados na área RF que diferiu dos valores de K encontrados na área RQ (Tabela 15). A área FN não diferiu ($P < 0,05$) quanto aos valores de K para o grupo de carboidratos das áreas de RF e RQ (Tabela 15). Valores de taxa exponencial máxima (R) foram encontrados para a utilização de carboidratos na área FN que diferiu do valor de R encontrado na área RF (Tabela 15). Não houve diferenças significativas ($P < 0,05$) para os valores de R encontrados entre as áreas de FN e RQ e, RF e RQ (Tabela 15). A análise dos valores correspondentes ao tempo para alcançar o ponto médio da fase exponencial (S) revelaram

diferenças significativas entre a área de RF e as áreas FN e RQ, no caso do grupo de carboidratos ($P < 0,05$; Tabela 15).

Tabela 15 – Valores de cinética K, R e S (valores médio e desvio padrão) dos diferentes grupos de substratos das áreas de floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima acidental (RQ), no PECJ

Áreas	Ac. Carboxílico	Aminas	Aminoácidos	Carboidratos	Miscelânea	Polímeros
Cinética K						
FN	0,945 ± 0,03a*	1,011 ± 0,08a	1,088 ± 0,08a	1,091 ± 0,06ab	0,747 ± 0,12 ^a	1,026 ± 0,10a
RF	0,936 ± 0,06 a	1,053 ± 0,12a	1,092 ± 0,06a	1,140 ± 0,08a	0,691 ± 0,16 ^a	0,957 ± 0,12a
RQ	0,940 ± 0,07a	0,987± 0,07a	1,055± 0,06a	1,085 ± 0,09b	0,756 ± 0,09 ^a	1,099 ± 0,18a
Cinética R						
FN	1,094 ± 0,17a	1,034 ± 0,21a	1,303 ± 0,12a	0,852 ± 0,16a	0,803 ± 0,55 ^a	0,590 ± 0,18a
RF	1,184 ± 0,13 a	1,261 ± 0,35a	1,239 ± 0,16a	0,684 ± 0,13b	0,839 ± 0,38 ^a	0,577 ± 0,19a
RQ	1,180 ± 0,16a	1,165± 0,24a	1,312± 0,22a	0,782 ± 0,16ab	0,702 ± 0,16 ^a	0,540 ± 0,10a
Cinética S						
FN	1,011 ± 0,09a	0,966 ± 0,19a	1,303 ± 0,12a	1,133 ± 0,13b	0,870 ± 0,12 ^a	1,026 ± 0,21a
RF	0,952 ± 0,09 a	1,037 ± 0,24a	1,239 ± 0,16a	1,242 ± 0,09a	0,921 ± 0,17 ^a	1,022 ± 0,20a
RQ	0,999 ± 0,06a	0,943± 0,11a	1,312± 0,22a	1,108 ± 0,10b	0,985 ± 0,37 ^a	1,189 ± 0,31a

*Médias seguidas da mesma letra, minúsculas nas linhas, não diferem entre si a 5% pelo teste LSD.

Resultados da análise NMDS e ANOSIM realizadas com os valores de K (R global = 0,037; $P < 0,05$), R (R global = 0,001; $P < 0,05$) e S (R global = 0,024; $P < 0,05$) não mostraram diferenças significativas para a utilização dos diferentes grupos de substratos nas áreas estudadas (Figura 20; Tabela 16).

Diferenças nos padrões de utilizações dos diferentes grupos de substratos entre áreas, podem-se relacionar com a maior ou menor habilidade das comunidades microbianas a degradar categorias específicas de material orgânico associado com diferentes vegetações (ZAK et al., 1994). No presente estudo, no entanto, os parâmetros cinéticos dos diferentes grupos de substratos revelaram um padrão similar na capacidade de utilização dos substratos das diferentes áreas. As diferentes áreas tiveram um similar padrão de consumo de grupos de substratos, porém com maior utilização do grupo de carboidratos, principalmente nas áreas FN e RQ, que apresentaram a maior taxa de oxidação deste grupo de substratos (Tabela 15). A área RF apresentou os maiores valores para S, o que provavelmente sugere uma menor densidade/ou menor taxa de crescimento de grupos microbianos capazes de utilizar fontes principais deste

grupo de substratos (Tabela 15), refletindo na composição principal do material orgânico desta área.

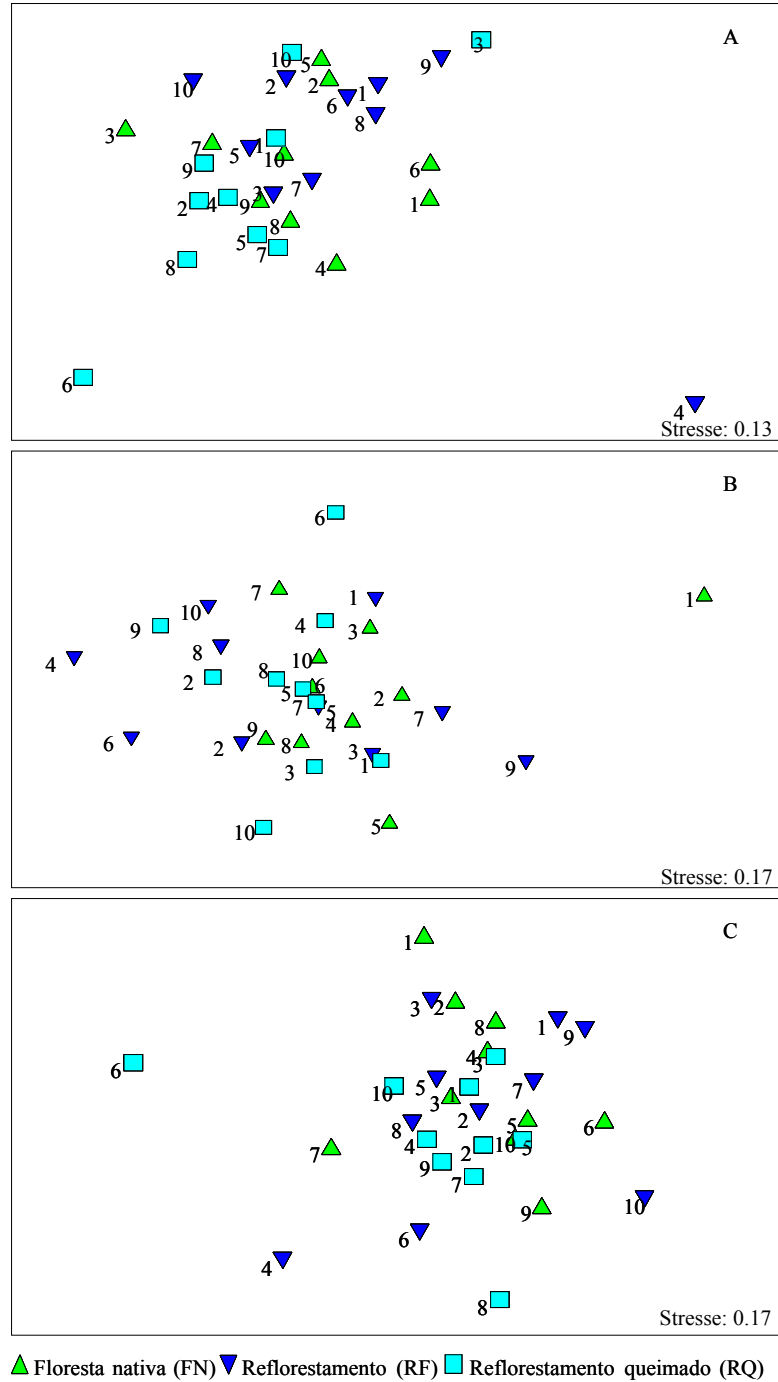


Figura 20 – Análise de escala multidimensional (NMDS) dos valores de cinética K (A), R (B) e S (C) para os grupos de substratos (ácido carboxílico, aminas, aminoácidos, carboidratos, miscelânea e polímeros) das áreas de floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima acidental (RQ), no PECJ

Tabela 16 – Resultado do teste *Pairwise* (Estatística R) dos valores de cinética K, R e S para os grupos de substratos (ácido carboxílico, aminas, aminoácidos, carboidratos, miscelânea e polímeros) nas áreas de floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima acidental (RQ), no PECJ

Áreas	Teste <i>Pairwise</i>
	K
FN, RF	0,006
FN, RQ	- 0,014
RF, RQ	0,099
	R
FN, RF	0,063
FN, RQ	- 0,047
RF, RQ	- 0,012
	S
FN, RF	- 0,016
FN, RQ	0,020
RF, RQ	0,078

Goberna et al. (2005), encontraram entre os carboidratos e aminoácidos as duas maiores categorias responsáveis por diferenças entre as amostras de áreas de plantação de pinus, área nativa com pinheiros e pastagem. Os autores encontraram um maior grau de consumo (K) de carboidratos e aminoácidos, com maior taxa de consumo (R) de carboidratos e polímeros em áreas de mata nativa com pinheiro, sendo estes grupos de substratos principalmente diferentes dos grupos preferenciais consumidos pela área de reflorestamento com pinus.

Porém, no presente estudo, os parâmetros cinéticos K, R e S não apresentaram peso suficiente na discriminação de grupos específicos de substratos nas áreas estudadas (Tabela 16). Isto pode estar associado provavelmente ao efeito de exaustão de fontes de C nos poços, não representando uma real similaridade nos padrões de utilização de C nas diferentes áreas como visto por Preston-Mafham et al. (2002) e Costa (2006), e verificado através da análise de componentes principais (ACP).

Embora a estatística R (ANOSIM) não detectou diferença entre as diferentes áreas para os parâmetros cinéticos determinados para cada grupo de substrato, uma análise de componentes principais (ACP) foi realizada com cada parâmetro cinético estimado para cada grupo de substrato com o objetivo de detectar a ocorrência de associação entre os grupos de substratos e as áreas amostradas, bem como a maior ou menor similaridade entre as amostras dentro de cada área.

O gráfico biplot da ACP para os valores K, R e S dos diferentes grupos de substratos é apresentado na Figura 21. A ACP mostrou que as áreas estudadas ficaram dispostas em

quadrantes separados e a associação de cada grupo de substrato foi diferenciada dependendo dos valores do parâmetro cinético avaliado (Figura 21A, B e C).

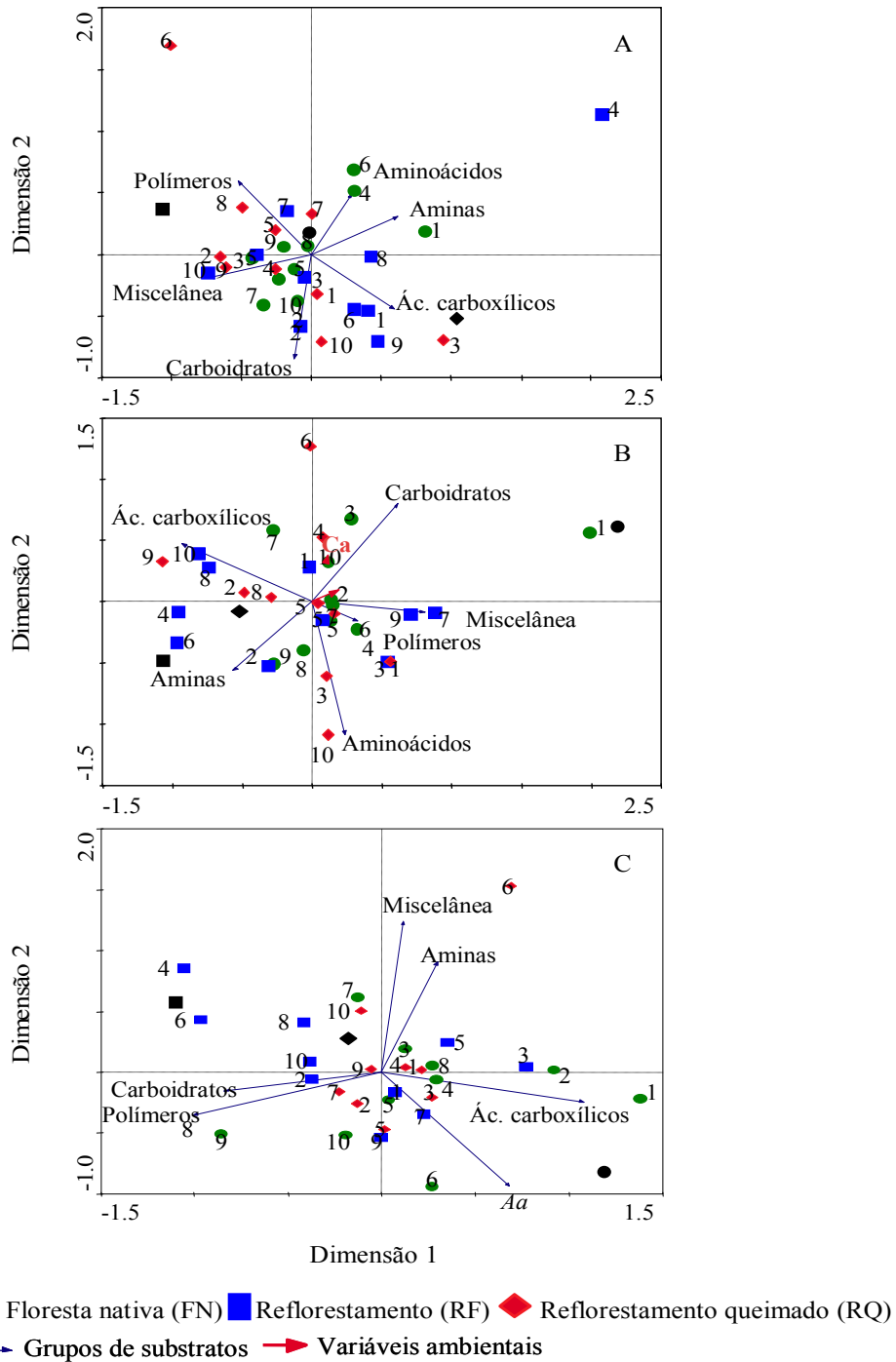


Figura 21 – Relação entre as dimensões 1 e 2 da análise de componentes principais (ACP), separando floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima acidental (RQ), e os grupos de substratos utilizados no método Biolog baseado nos dados de cinética K(A), R (B) e S (C). Símbolo negro representa o centróide de cada área

Para os níveis de utilização dos substratos (K) as primeiras duas variáveis explicam 60,6% da variância dos dados, sendo que a percentagem de variância explicada pela dimensão 1 é de 33,5% enquanto, a dimensão 2 explica 27,1% da variabilidade dos dados (Figura 21A). O RF apresentou forte associação com o grupo de polímeros, enquanto o RQ associou-se aos ácidos carboxílicos (Figura 21A). A área de FN ficou disposta na porção central do gráfico, não se associando fortemente a nenhum grupo de substrato específico (Figura 21A).

Para os valores da taxa exponencial (R) as primeiras duas variáveis explicam 58,2% da variância dos dados, sendo que a percentagem de variância explicada pela dimensão 1 é de 36,5% enquanto, a dimensão 2 explica 21,7% da variabilidade dos dados (Figura 21B). As áreas RF e RQ ficaram muito próximas entre si, sendo o arranjo dos grupos de substratos bem semelhante nestas duas áreas, com uma forte associação, especialmente, da área RF com o grupo de amins (Figura 21B). Já a área FN ficou disposta no quadrante superior a direita (Dimensão 1), com valores positivos e fortemente associados ao grupo de carboidratos (Figura 21B).

Para o tempo de alcance do ponto médio da fase exponencial (S) as primeiras duas variáveis explicam 52,1% da variância dos dados, sendo que a percentagem de variância explicada pela dimensão 1 é de 29,7% enquanto, a dimensão 2 explica 22,4% da variabilidade dos dados (Figura 21C). As áreas de RF e RQ dispostas no quadrante superior esquerdo, com similaridade em termos de utilização de substratos, entretanto não se associam fortemente a nenhum grupo específico de substrato (Figura 21C). Por outro lado, a FN ficou fortemente disposta no quadrante inferior esquerdo e ficou fortemente associada aos ácidos carboxílicos (Figura 21C).

Os dados da ACP sugerem que o maior grau de consumo de substratos esteja associado aos polímeros na área RF e aos ácidos carboxílicos na área RQ. Enquanto, na área FN ocorre a utilização dos diferentes grupos de substratos sem associação específica com nenhum grupo. A maior taxa de consumo de substrato ocorreu para o grupo amina em RQ e principalmente RF, e carboidratos na área FN. Sendo o parâmetro cinético K uma medida do potencial metabólico, a área FN apresentaria uma estrutura de comunidade mais dinâmica, capaz de utilizar eficientemente diferentes grupos de substratos, enquanto as demais áreas, RF e RQ, apresentariam um potencial fisiológico mais restrito, com comunidades microbianas capazes de utilizar preferencialmente grupos específicos de substratos.

Estudos relacionam a maior utilização de carboidratos como uma resposta a perturbações das comunidades microbianas à incrementos relacionado a diferentes fontes de resíduos orgânicos (BOSSIO; SCOW, 1995) com entradas adicionais ao solo ou um decréscimo relacionado ao estresse por metais (LEHMAN et al., 1997), ou introdução de altos níveis de *Corynebacterium* no solo (VAHJEN; MUNCH; TEBBE, 1995).

Assim como o presente estudo, Larkin (2003), também encontrou diferenças no consumo de diferentes grupos de substratos, principalmente amina, aminoácidos e ácidos carboxílicos em diferentes sistemas de cultivo. Da mesma forma, Goberna et al. (2005) observaram diferença na utilização de aminas, carboidratos, ácidos carboxílicos e polímeros em perfis de solos de florestas do Mediterrâneo. Grayston e Prescott (2005), encontraram diferenças na utilização de diferentes grupos de substratos pelas comunidades microbianas de diferentes espécies vegetais de solos de florestas no Canadá.

A análise de perfis fisiológicos não possibilita, no entanto, uma avaliação direta das comunidades microbianas, porém, é um método rápido e viável para a obtenção de informações da dinâmica fisiológica das comunidades microbianas encontradas em diferentes tipos de solos (GARLAND, 1997), podendo ser utilizado como um indicador de versatilidade metabólica potencial dessas comunidades (COSTA, 2006; GOMES; FERRERAS; TORESANI, 2006).

2.3.7 Perfis de ácidos graxos ligados a ésteres de fosfolipídios (PLFAs) das comunidades microbianas

As áreas FN, RF e RQ tiveram inicialmente perfis similares de ácidos graxos ligados a ésteres de fosfolipídios (PLFAs) dominantes: 16:0, *cy*19:0 e *i*15:0, porém com uma maior diversidade global de PLFAs encontrada na área de RQ (Tabela 17). A área RQ apresentou o maior número de ácidos graxos únicos não identificados nas demais áreas, como: 17:0, 15:1 ω 6c, *i*14:0, *cy*17:0, 16:1 ω 7c, *a*17:1 ω 9c e 21:13OH; enquanto na área FN foi detectada uma alta concentração de 16:0 N álcool (Tabela 17). Toda a diversidade de ácidos graxos encontrada na área RF esteve representada nas demais áreas, com exceção do ramificado *a*13:0, não encontrado em FN ou RQ (Tabela 17).

Tabela 17 – Perfis de ácidos graxos ligados a ésteres de fosfolipídios (PLFAs) encontrados em solos de áreas de floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima acidental (RQ), no PECJ. Valores são expressos como a % total de PLFA ($n=10$)

PLFA	FN	RF	RQ
Saturado			
9:0	ND	0,46	1,28
10:0	ND	2,12	0,98
12:0	2,09	1,63	1,75
14:0*	3,98	3,13	2,83
16:0*	33,43	30,89	25,23
17:0	ND	ND	0,35
18:0	8,24	7,00	5,25
Insaturado			
15:1 ω 6c	ND	ND	0,46
16:1 ω 7c	ND	ND	1,97
18:1 ω 9c*	3,60	2,82	3,14
18:2 ω 6,9,12c	ND	0,53	1,46
18:3 ω 6,9,12c*	6,89	4,87	6,47
Ramificado			
<i>a</i> 13:0	ND	0,51	ND
<i>i</i> 14:0	ND	ND	1,32
<i>i</i> 15:0*	12,98	14,84	9,13
<i>a</i> 15:0*	0,71	3,12	5,33
<i>i</i> 16:0 *	5,91	5,81	8,57
<i>i</i> 17:0 *	0,63	1,47	0,28
<i>a</i> 17:0*	ND	2,21	1,83
Hidróxi			
21:1 3OH	ND	ND	2,65
Ciclopropano			
<i>cy</i> 17:0	ND	ND	1,18
<i>cy</i> 19:0 *	13,91	14,13	13,94
Misturado			
<i>i</i> 16:1 I*	0,69	0,30	0,58
<i>a</i> 17:1 ω 9c	ND	ND	0,33
Alcool			
16:0 N alcohol*	10,53	4,17	3,68

*PLFAs utilizados para as análises multivariadas. ND=Não detectado.

Os fosfolipídios são componentes essenciais das membranas de todas as células vivas, não sendo encontrados em produtos armazenados no solo ou em células mortas (ZELLES, 1999). Resultados de estudos com sedimentos e solos com adições de substratos indicam que mudanças

rápidas na estrutura de comunidades microbianas podem ser detectadas por mudanças nos padrões de PLFAs, sugerindo que a análise de PLFAs pode ser eficaz na detecção de mudanças nas populações microbianas ativas dos solos (WHITE et al., 1979; ZELLES, 1999). Estudos envolvendo sistemas florestais também mostram que técnica de análise de PLFAs é conveniente para o estudo de estruturação das comunidades microbianas do solo (FROSTERGÅRD; BÁÁTH, 1996; HACKL et al., 2005; GRAYSTON; PRESCOTT, 2005; GRAYSTON; RENNENBERG, 2006), no entanto, essa técnica não permite a identificação das espécies de microrganismos dessa comunidade.

Dentre os PLFAs abundantes nas três áreas tem-se o 16:0, um fosfolípido saturado de cadeia curta abundante nos solos (IBEKWE; KENNEDY, 1998; SCHUTTER; DICK, 2000; WILKINSON et al., 2002) e característico de bactérias (LECHEVALIER; LECHEVALIER, 1998). Os outros PLFAs mais abundantes nas três áreas: o ciclopropano *cy19:0* e o ramificado *i15:0* são característicos de bactérias Gram-negativas (GUCKER et al., 1986) e Gram-positivas (O'LEARY; WILKINSON, 1988), respectivamente.

Para os PLFAs únicos apenas encontrados na área RQ temos o ramificado *i14:0* característico de bactérias Gram-positivas (O'LEARY; WILKINSON, 1988), além do ciclopropano *cy17:0* e o insaturado 16:1 ω 7c, ambos característicos de bactérias Gram-negativas (O'LEARY; WILKINSON, 1988), e também utilizados como indicadores de estresse (GUCKER et al., 1986; RATLEDGE; WILKINSON, 1988).

PLFAs como os encontrados em FN e RF, respectivamente, *a13:0* e 16:0 N álcool, não estão relacionados especificamente a nenhum grupo de organismos. Alguns estudos envolvendo bibliotecas de organismos aeróbios revelam grande quantidade relativa de 16:0 N álcool presentes em perfis de PLFAs de poucas espécies de *Moraxella*, uma cocobacilo Gram-negativo pertencente a classe *Betaproteobacteria* (SASSER, 1990). Em estudos com bactérias piezófilas (FANG et al., 2007) e bactérias redutoras de sulfato em lagos poluídos com mercúrio (MACALADY et al., 2000), foi encontrado o ramificado *a13:0* como constituinte de membrana.

Pela contribuição relativa de PLFAs individuais mostra-se que as comunidades microbianas dos solos das áreas apresentam diferenças na composição de PLFAs (Tabela 17). Dados do perfil de PLFAs das três áreas avaliadas foram submetidos a análise de componentes principais (ACP) e são apresentados na Figura 22. A variabilidade dos dados é explicada em 33,4% pela dimensão 1 e 16,9% pela dimensão 2, totalizando 50,3% da variabilidade total dos

PLFAs analisados (Figura 22). A terceira e quarta dimensões (componentes principais) explicaram respectivamente, 12,4 e 10,6% da variabilidade total. Como as dimensões 1 e 2 (componentes principais 1 e 2) responderam por mais de 50% da variabilidade dos dados no presente trabalho, as dimensões 3 e 4 foram desconsideradas. A baixa percentagem explicada pelas componentes principais 1 e 2 (Dimensão 1 e 2), se deve a alta variabilidade dos dados. Contudo, podemos verificar por meio dos centróides (ponto médio) a maior ou menor associação de cada PLFAs para cada áreas.

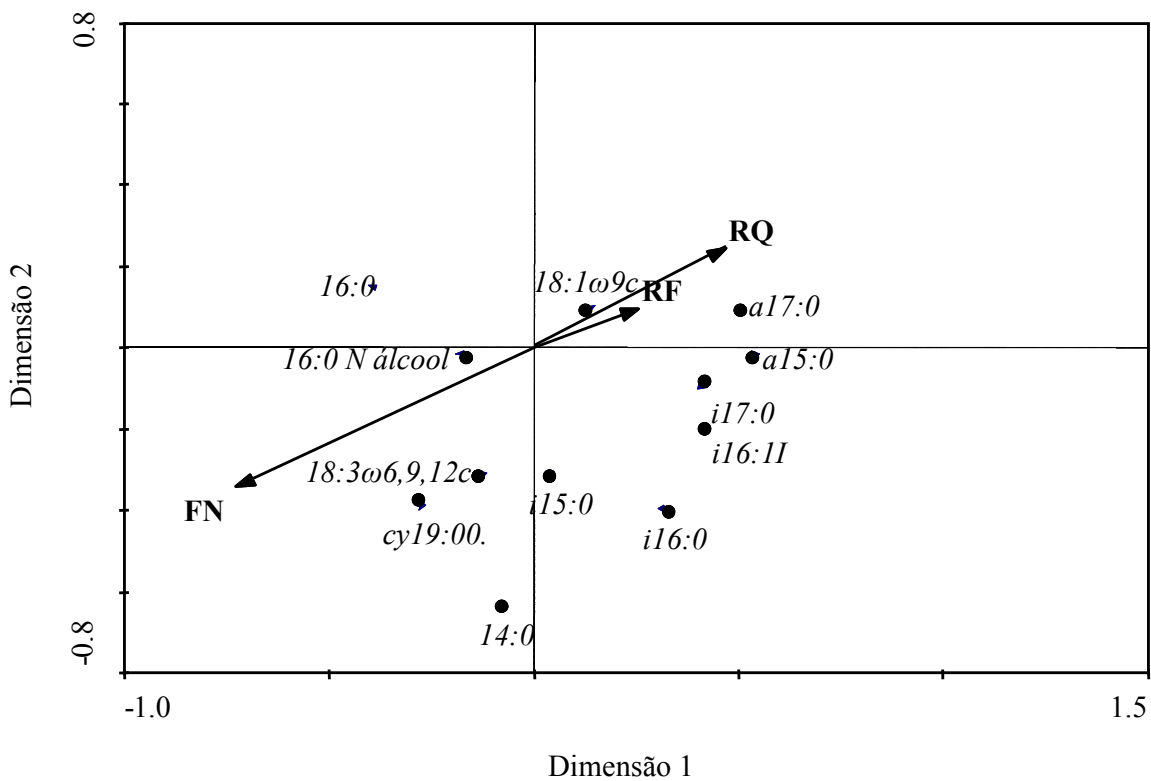


Figura 22 – Análise de componentes principais (ACP) dos perfis de ácidos graxos ligados a ésteres de fosfolípidios (PLFAs) das áreas de floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima acidental (RQ), no PECJ. Flechas representam o centróide das amostras dentro de cada área

Evidenciou-se por meio da relação entre as dimensões 1 e 2 que as áreas de RF e RQ apresentaram composição similar em termos de PLFAs, sendo estas diferentes da área de FN (Figura 22). Ao longo da dimensão 1 (quadrante inferior esquerdo) a área de FN ficou completamente separada das áreas de RF e RQ, ficando associada aos seguintes PLFAs: *cy19:0* e *18:3ω6,9,12c*, porém não fortemente; enquanto as áreas RF e RQ, dispostas no quadrante

superior direito apresentaram os maiores valores (fortemente associadas) com os PLFAs: *a17:0* e *a15:0* (Figura 22). Ainda podemos observar, que alguns PLFAs não se associaram fortemente a nenhuma das áreas como: *16:0*, *16:0 N álcool* (quadrante superior esquerdo) e, *15:0*, *i16:0*, *i16:1I*, *i17:0* (quadrante inferior direito) (Figura 22). Esse comportamento pode ser explicado pela semelhança nos valores dos dados entre as áreas estudadas, conforme observado na Tabela 17.

No entanto, os resultados da análise NMDS realizada com os dados de PLFAs das áreas seguida do teste de significância ANOSIM, mostram não haver diferenças significativas entre as áreas estudadas ($R_{\text{Global}} = -0,073$; $P < 0,05$) quanto aos seus perfis de PLFAs (Figura 23).

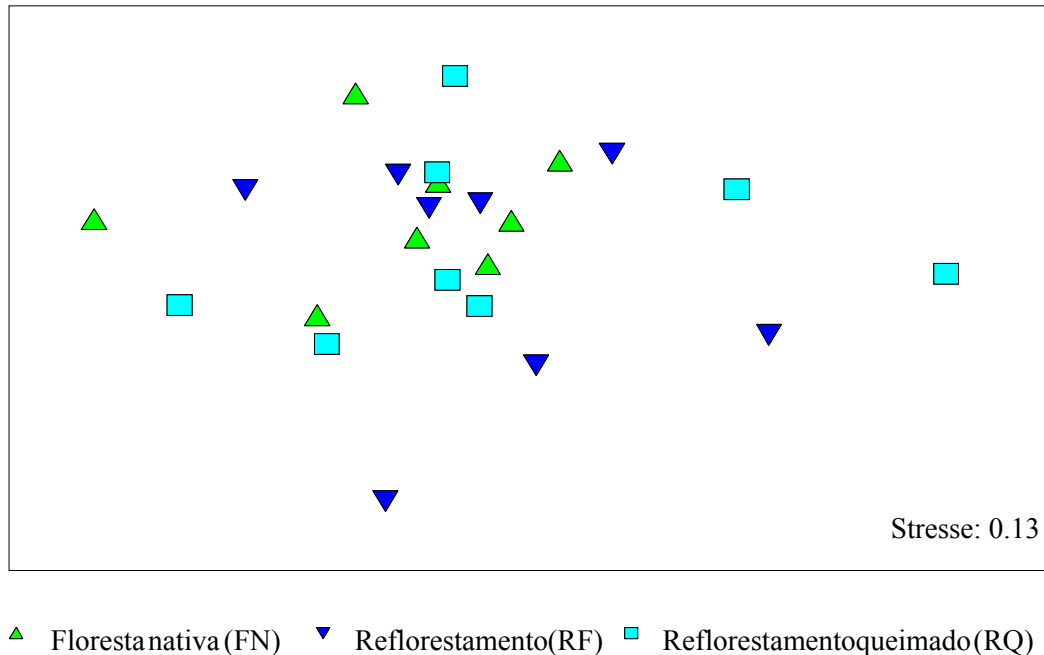


Figura 23 – Análise de escala multidimensional (NMDS) com ANOSIM de ácidos graxos ligados a ésteres de fosfolipídios (PLFAs) das áreas de floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima acidental (RQ), no PECJ

Concentrações de alguns PLFAs selecionados individualmente como biomarcadores também variou entre as áreas avaliadas (Tabela 17). Dentre os biomarcadores encontrados nas áreas, uma elevada proporção relativa de bactérias Gram-positivas (*i14:0*, *i15:0*, *a15:0*, *i16:0*, *i16:1 I*, *i17:0* e *a17:0*) foi encontrada nas três áreas, com maiores quantidades relativas nas áreas RF e RQ (Tabela 17). Biomarcadores para bactérias Gram-negativas (*cy17:0*, *cy19:0*, *16:1ω7c álcool*) e fungos (*18:1ω9c*, *18:2ω6,9,12c* e *18:3ω6,9,12c*) também foram encontrados em grande proporção nos PLFAs identificados nas três áreas, com maior proporção relativa encontrada na

área RQ (Tabela 17). PLFAs biomarcadores para o estresse fisiológico também foram identificados (*cy17:0*, *cy19:0* e *16:1 ω 7c* álcool), principalmente na área RQ (Tabela 17).

A composição de PLFA de organismos pode variar de acordo com as condições ambientais e atividade celular (HAACK et al., 1994; LECKIE, 2005; VESTAL; WHITE, 1989). Incrementos na razão de isômeros *trans* a *cis* *16:1 ω 7* têm sido associados ao estresse nutricional para bactérias (HEIPIEPER et al., 1996). PLFAs ciclopropil mostram um incremento relativo de seus precursores monoenóicos durante fases prolongadas de crescimento estacionário de algumas bactérias, bem como, durante o crescimento sob baixas concentrações de oxigênio e C, baixo pH e alta temperatura (GUCKERT; HOOD; WHITE, 1986; RATLEDGE; WILKINSON, 1988). Desta maneira, incrementos de *cy17:0* e *cy19:0*, relativo aos seus respectivos precursores metabólicos, *16:1 ω 7c* e *18:1 ω 7*, podem indicar um estresse fisiológico quando de mudanças significativas na composição das comunidades microbianas (LECKIE, 2005). No entanto, valores menores que 0,5 para a razão entre ciclopropil e *16:1 ω 7c* álcool indicam populações microbianas saudáveis, não caracterizando uma condição de estresse (GUCKERT; HOOD; WHITE, 1986; RATLEDGE; WILKINSON, 1988). Para a área RQ os valores da razão ficaram em torno de 0,44 e 1,0 caracterizando uma condição de estresse para a comunidade microbiana.

Não houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre as concentrações de PLFAs indicadores de bactérias (somatórios dos PLFAs: *14:0*, *16:0*, *i14:0*, *i15:0*, *a15:0*, *i16:0*, *i16:1 I*, *i17:0* e *a17:0*) e fungos totais (somatório dos PLFAs: *18:1 ω 9c*, *18:2 ω 6,9,12c* e *18:3 ω 6,9,12c*) (% molar) identificados em cada área (Figura 24). As áreas FN, RF e RQ mostraram uma baixa relação fungo:bactéria (0,14; 0,11 e 0,14, respectivamente), indicando uma maior concentração de PLFAs de bactérias do que os PLFAs de fungos (Figura 24). Esses dados são corroborados por Wilkinson et al. (2002) e Grayston e Prescott (2005), os quais encontraram uma maior composição da biomassa bacteriana em relação à biomassa fúngica, medida por PLFAs, em solos de florestas na Alemanha e no Canadá.

Grayston e Prescott (2005), atribuem o aumento da proporção de biomassa bacteriana em relação à biomassa fúngica as maiores concentrações de Ca, Mg e K, o que proporcionaria a elevação do pH, além de uma maior saturação por bases. Um pH mais elevado pode favorecer o crescimento de bactérias, ocasionando uma diminuição da biomassa fúngica dos solos (GRAYSTON; PRESCOTT, 2005; KILLHAM, 1994). No entanto, para o presente estudo, os solos das três áreas apresentaram baixa disponibilidade de cátions metálicos básicos (Ca e Mg),

sendo apenas o K encontrado em valores mais elevados nos solo; além, do baixo pH e, conseqüente, baixa saturação por bases (Tabela 3; item 2.3.1).

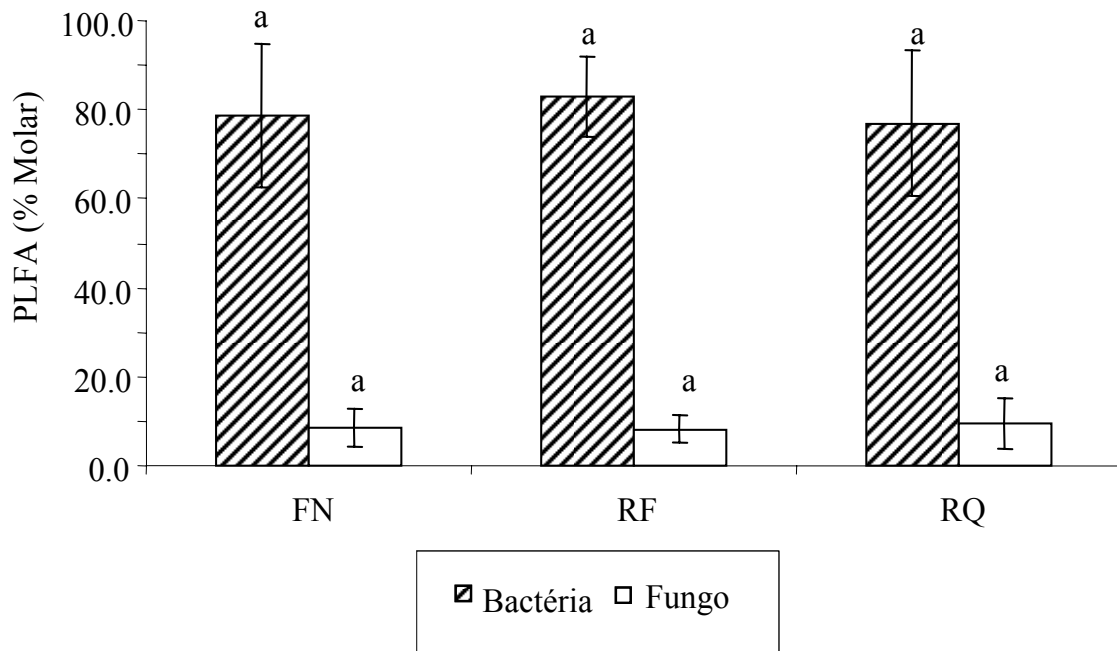


Figura 24 – Concentração total de PLFA de bactérias e fungos (% molar \pm DP) em solos de áreas de floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima acidental (RQ), no PECJ

A dependência da composição da comunidade microbiana em relação ao pH do solo tem sido demonstrada experimentalmente por incubações de solos com acetato marcado no C^{13} a diferentes valores de pH (ARAO, 1999). Os dados mostram que a diminuição do pH do solo levou a incorporação preferencial do carbono marcado em PLFAs 18:2 ω 6,9,12c, 16:0 e 18:1 ω 9c, sendo o C^{13} baixo ou não detectado em muitos PLFAs bacterianos, sugerindo que em pH baixo o crescimento de algumas bactérias seria inibido, com conseqüente predomínio de populações fúngicas. Semelhantemente, Frostergård e Bååth (1996) encontraram uma alta relação entre biomassa fúngica e bacteriana em solos ácidos de florestas de coníferas, quando comparado a solos de pH mais elevado, baseado em seus perfis de PLFAs.

Para o presente estudo essa inversão da relação existente entre fungos e bactérias em solos ácidos de florestas pode indicar uma condição específica do ecossistema. Porém, não podemos descartar possíveis limitações metodológicas na extração dos PLFAs. A ausência do PLFA

18:2 ω 6c na área de FN pode indicar uma ineficiência metodológica na extração de alguns PLFAs representativos no solo, principalmente se considerarmos a associação deste PLFA específico, a áreas de elevada colonização micorrízica. Estudos preliminares realizados nas áreas mostram uma elevada colonização micorrízica da espécie araucária nos solos das três áreas, como os maiores valores significativos encontrados na área de FN que diferiu das demais áreas (MOREIRA et al., 2006).

A área de RQ apresentou os maiores valores para 18:2 ω 6c e demais PLFAs relacionados a biomassa fúngica, porém com menor biomassa fúngica em relação a biomassa microbiana (Tabela 17). Estudos mostram que o efeito do fogo espontâneo em solos florestais afeta mais significativamente a biomassa fúngica do que a biomassa bacteriana (BÁÁTH et al., 1995; VÁZQUEZ; ACEA; CARBALLAS, 1993); sendo os fungos micorrízicos principalmente destruídos pelo aquecimento do solo (DÍAZ-RAVINA et al., 2006). Subseqüentemente, a recomposição da área após o fogo por espécies fúngicas torna-se mais lenta quando comparada à proliferação de espécies bacterianas, devido principalmente à elevação temporária do pH e o aumento da disponibilidade de nutrientes (DÍAZ-RAVINA et al., 2006).

Entre os PLFAs biomarcadores para fungos uma maior concentração foi encontrada para o insaturado 18:3 ω 6,9,12c nas três áreas estudadas (Tabela 17). O PLFA 18:3 ω 6,9,12c é encontrado em *Mucoraceae*, *Oomycetes*, *Chytridomycetes*, *Hyphochytriumycetes* e *Zygomycetes* (STEINER et al., 1988). No grupo dos Oomycetes há alguns patógenos de plantas como as espécies de *Phytophthora* e *Pythium* (STEINER et al., 1988).

Para o agrupamento de PLFAs específicos considerados biomarcadores para fungos, bactérias Gram-positivas e negativas, a ACP explicou ao longo da dimensão 1 46,5% da variabilidade dos dados, enquanto a dimensão 2 explicou 32,7% da variabilidade restante. Conjuntamente, as dimensões 1 e 2 totalizam 79,2% da variabilidade total dos PLFAs biomarcadores analisados (Figura 25).

Podemos verificar por meio dos centróides (ponto médio) a maior ou menor associação de cada grupo de organismos para cada área, evidenciando-se por meio da relação entre as dimensões 1 e 2 que as áreas de FN e RF apresentaram composição similar em termos de grupos de organismos identificados através dos seus PLFAs característicos, sendo estas diferentes da área de RQ (Figura 25). O quadrante superior direito separa as áreas de FN e RF que não ficaram fortemente associadas a nenhum grupo de organismos específicos identificados através da

composição de seus PLFAs (Figura 25). Enquanto a área de RQ, dispostas no quadrante inferior esquerdo apresentaram os maiores valores (fortemente associadas) com os PLFAs biomarcadores para bactérias Gram-negativas (Figura 25). Díaz-Ravina et al. (2006), ao avaliarem o efeito do fogo sob a comunidade bacteriana de dois Cambissolos húmicos de florestas da região de Galícia na Espanha, encontraram que o fogo tende a diminuir a concentração relativa de bactérias Gram-positivas no solo, com o aumento relativo de PLFAs de bactérias Gram-negativas nestes solos.

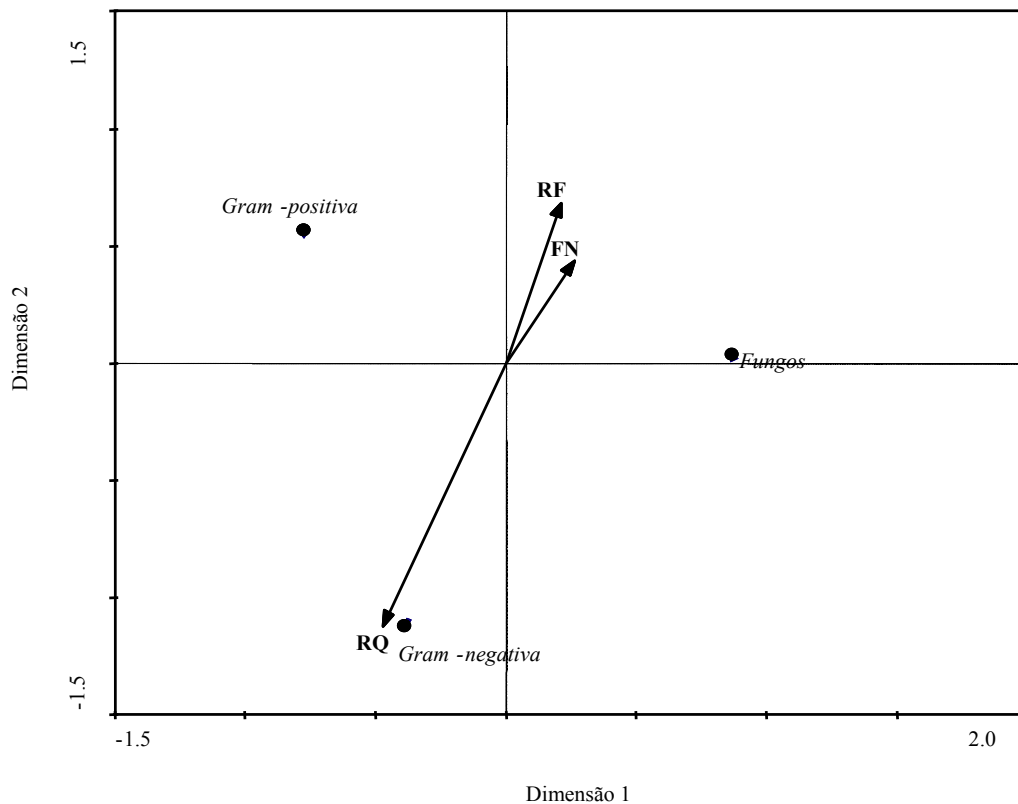


Figura 25 – Análise de componentes principais (ACP) dos perfis de ácidos graxos ligados a ésteres de fosfolipídios (PLFAs) biomarcadores para bactérias Gram-positiva, Gram-negativa e fungos das áreas de floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima acidental (RQ), no PECJ. Flechas representam o centróide das amostras dentro de cada área

As áreas FN e RF apresentaram baixas relações encontradas para bactérias Gram-negativas: Gram-positivas de seus solos (0,66 e 0,51), semelhantemente ao encontrada para RQ (0,63) (Tabela 17). Bactérias Gram-positivas apresentam entre seus representantes gêneros como *Bacillus*, *Clostridium* e *Actinomicetes*, caracterizados pela formação de esporos e alta capacidade de sobrevivência em condições adversas (SCHLEGEL, 1992). Tais organismos foram

identificados em bibliotecas de clones do gene rRNA 16S nas três áreas estudadas (Tabela 8; item 2.3.5.1). A maior relação existente entre bactérias Gram-negativas: Gram-positiva encontrada nos solos das áreas não reflete uma maior capacidade de sobrevivência de Gram-negativas comparadas a Gram-positivas, mas sim, uma maior capacidade de crescimento quando do aumento da disponibilidade de nutrientes devido à morte de microrganismos e solubilização da MOS pelo aquecimento do solo (DÍAZ-RAVINA; PRIETO; CARBALLAS, 1992).

Corroborando o presente estudo, Grayston e Rennenberg (2005) encontraram em floresta na Europa um predomínio de bactérias Gram-positivas, bem como menor biomassa fúngica em relação à biomassa microbiana. Tscherko et al. (2004) reportaram uma mudança nas comunidades microbianas de bactérias Gram-negativas a Gram-positivas, ao longo de estágios sucessionais de ecossistemas alpinos, de pioneiras à maturidade, e sugerem ser um indicativo de uma mudança na composição de comunidades quimiolitotróficas (principalmente Gram-negativas) para comunidades heterotróficas, como uma resposta ao incremento da disponibilidade de C.

2.3.8 Relação entre diversidade bacteriana e funções da microbiota em solos de Florestas de Araucária

Ainda pouco se sabe sobre as relações existentes entre diversidade microbiana e suas funções nos solos. Quando comparado aos outros habitats, os solos florestais apresentam uma alta diversidade de microrganismos (TORSVIK; ØVREÅS; THINGSTAD, 2002), sendo esta influenciada pela complexidade dos solos. Essa complexidade permite o isolamento de diferentes grupos microbianos em microhabitats, os quais se caracterizam por partições de diferentes recursos a diferentes profundidades, com relações entre gradientes químicos encontrados (LECKIE, 2005; TREVES et al., 2003). Enquanto estudos evidenciam que os solos apresentam alta diversidade microbiana, menos claro é a relação entre essa diversidade e o funcionamento de ecossistemas (LECKIE, 2005).

Dados de literatura não suportam totalmente a teoria de que à medida que se diminui a diversidade microbiana de um ecossistema, processos bioquímicos possam ser completamente inibidos (GRIFFITHS et al., 2001; SETÄLÄ; McLEAN, 2004). Isso porque uma determinada função bioquímica pode ser redundante e a perda de uma espécie poderia ser compensada pela

presença de outras, que desempenhariam a mesma função no sistema, contribuindo para a manutenção de processos bioquímicos (KENNEDY, 2003; ZILLI et al., 2003). Um solo que apresenta uma alta redundância de funções no ecossistema provavelmente é capaz de manter o equilíbrio dos processos ecológicos, mesmo sob um distúrbio, o que caracteriza a sua capacidade de resiliência ou, o tamponamento dos efeitos dos distúrbios externos ao ecossistema (ZILLI et al., 2003).

O presente estudo evidencia que a estrutura das comunidades bacterianas encontradas em cada área é distinta, mesmo que os índices de diversidade sejam similares. Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos que avaliam diferentes tipos de florestas dentro de regiões climáticas, e mostram que a composição das comunidades microbianas tem se mostrado diferente onde a biomassa microbiana apresenta-se similar (LECKIE et al, 2004; MYERS et al, 2001; PENNANEN et al., 1999).

As plantas exercem uma forte influência na composição das comunidades microbianas dos solos através da rizodeposição e depósito de restos vegetais que se acumulam na superfície do solo formando a chamada liteira (CURL; TRUELOVE, 1986; NANNIPIERI et al., 2003). Incrementos na produção de liteira e mudanças potenciais na qualidade da MOS podem afetar o crescimento da biomassa microbiana, sua atividade e composição de sua comunidade (ZAK et al, 2000). Da mesma maneira, a atividade humana e os distúrbios naturais em sistemas florestais apresentam efeito na funcionalidade dos solos de florestas, pelas alterações na estrutura de suas comunidades microbianas.

Provavelmente, as diferenças quanto à composição vegetal de cada área avaliada, associada a parâmetros químicos e físicos possam influenciar na estrutura das comunidades bacterianas. O solo da área FN apresentou maior CBM, atividade microbiana (C-CO₂) e relação CBM:COT quando comparado ao solo RF e RQ (Tabela 4, item 2.3.2). Tais características sugerem diferenças quanto à qualidade do material orgânico encontrada em cada área associada a maior disponibilidade de nutrientes pela ciclagem deste material na área FN.

Dados quantitativos e qualitativos sobre a composição da estrutura de comunidades bacterianas podem nos dar melhores conclusões sobre a dinâmica de um sistema. A distinta composição das comunidades bacterianas encontradas nas áreas pode determinar a funcionalidade das mesmas, como visto pelos dados apresentados na Tabela 4. Desta maneira, embora a área de FN tenha apresentado uma menor diversidade medida pelo seu índice de

Shannon (Tabela 9), quando comparada à área RQ, a composição de sua comunidade apresenta-se mais eficaz na utilização das fontes de C (Biolog; Tabela 12), com maior capacidade de acúmulo de C em sua biomassa, e menores perdas relativas de C (qCO_2) (Tabela 4).

Saetre e Bååth (2000) sugerem que a composição da comunidade microbiana esteja relacionada à influência das espécies vegetais na composição da MOS, mais do que o efeito específico da espécie vegetal sobre aspectos de umidade do solo, luminosidade e vegetação rasteira. O tipo de vegetação encontrada nas três áreas reflete a ação humana e distúrbios naturais aplicados às áreas. A área FN caracteriza-se como uma típica Floresta Ombrófila Mista, composta por diversos grupos de espécies vegetais junto à espécie araucária. As condições climáticas da região permitem que nesta área (FN) a camada superficial ou liteira alcance alguns centímetros, acumulando grande quantidade de material orgânico composto de diversos restos vegetais oriundos da queda de galhos, folhas e outras estruturas vegetativas das árvores. Desta maneira, tais condições permitem uma maior diversidade de microhabitats neste solo, com condições físicas e químicas distintas, influenciando a diversidade a ela associada. Nesse ambiente a maior disponibilidade de nutrientes é dada principalmente pela MOS responsável pela nutrição mineral das plantas em solos de baixa fertilidade dos ecossistemas naturais, bem como pela manutenção da atividade metabólica dos microrganismos presentes no solo.

Para as áreas de RF e RQ, as diferenças de suas comunidades bacterianas também podem ser explicadas pela diferente composição vegetal das áreas (ROBIM et al., 1990). A área RF caracteriza-se por um típico reflorestamento com predomínio da *Araucaria* sp. e de podocarpus com baixo número de outras espécies vegetais. Tais características influenciam diretamente na qualidade química deste solo, que embora menos ácido quando comparado aos solos de FN e RQ, apresentou a menor fertilidade natural (Tabela 3). Conseqüentemente, a composição da liteira formada principalmente pelas acículas produz um material orgânico menos rico e de menor qualidade, interferindo sobre a comunidade microbiana encontrada neste solo; podendo selecionar grupos de organismos específicos com capacidade de decomposição deste tipo de material. Isso pode ser visto na análise de estrutura da comunidade microbiana por DGGE, onde as bandas detectadas evidenciam uma estrutura de comunidade bacteriana para a área RF, completamente distinta da encontrada para a área FN (Figura 6; item 2.3.3). Uma provável seleção de populações bacterianas específicas em função da composição da rizosfera e liteira,

também foi verificada por Silveira et al. (2006), ao comparar um solo florestal a uma floresta plantada de eucalipto.

A área de RQ embora seja também um reflorestamento, apresenta características muito distintas quando comparada à RF. A condução do replantio de espécies de araucária permitiu maiores espaçamentos entre as plantas. O fogo acidental também foi responsável por aumentar ainda mais esse espaçamento, pelo surgimento de clareiras que permitiram uma recomposição natural de outras espécies vegetais presentes na área. Mesmo com o predomínio de gramíneas, espécies típicas da floresta natural também são encontradas em RQ. A associação de uma maior diversidade vegetal a uma provável MOS de maior qualidade quando comparada a RF, permite uma comunidade bacteriana distinta da área RF. No entanto, o efeito do fogo acidental estimulou o surgimento de espécies vegetais novas e uma reestruturação de sua comunidade frente ao distúrbio, tornando-a distinta da área de FN.

Quando da aplicação de um agente de distúrbio externo à medida que a vegetação se restabelece, a diversidade metabólica microbiana cresce rapidamente; porém, em estádios mais avançados de sucessão vegetal, a abundância relativa das atividades metabólicas se reduz, mantendo-se estáveis (TORSVIK; ØVREÅS, 2002). Isso provavelmente explicaria a maior diversidade bacteriana estimada para a área de RQ através do índice de diversidade de Shannon, quando comparada à área de FN.

Os conceitos de diversidade e riqueza se complementam, mas não necessariamente uma maior diversidade pode refletir-se em maior riqueza. Desta maneira as comunidades bacterianas dos solos estudados podem refletir diferenças quanto a sua complexidade e estabilidade. A maior riqueza e equitabilidade de UTOs encontrada na área RQ através das diferentes medidas de diversidade refletem uma maior complexidade de sua comunidade bacteriana, possivelmente em resposta a sua composição vegetal e ao distúrbio empregado na área através do fogo. Essa complexidade inclui além de um maior número de espécies presentes, uma distribuição mais equitativa da abundância destas espécies, com maior número de interações tróficas entre si, e com maior efeito da densidade de espécies mais abundantes sobre a taxa de crescimento de outras espécies (PINTO-COELHO, 2000). Desta maneira, a complexidade desta comunidade bacteriana a torna diferente de FN e RF, porém não assegura totalmente uma maior resiliência. Para a área FN os dados sugerem uma condição de maior estabilidade, o que reflete diretamente em uma estrutura de comunidade bacteriana diferente da encontrada nas demais áreas, e com maior

capacidade de resiliência em resposta a uma condição de distúrbio (PINTO-COELHO, 2000). Uma maior representação de filos, classes e ordens encontrados em FN sugere uma maior resiliência do solo da área FN, mesmo com uma menor diversidade de diferentes espécies dentro desses filos (Tabela 8).

As três áreas apresentaram um grande número de seqüências não afiliadas taxonomicamente podendo representar novas espécies. A análise multivariada mostrou que embora a composição bacteriana das três áreas seja distinta, existe uma maior associação de grupos específicos de organismos as diferentes áreas. As áreas FN e RQ apresentaram elevada associação com UTOs afiliadas taxonomicamente aos filos *Proteobacteria* e *Acidobacteria*, bem como UTOs representativas dos demais filos detectados (Figura 16). Para RF a sua associação esteve intimamente relacionada à UTOs afiliadas ao filo *Acidobacteria*. A grande maioria dos estudos relaciona a maior freqüência de seqüências afiliadas a filo *Acidobacteria* em solos de florestas ácidas de ecossistemas ambientais de clima temperado, sendo esta informação ainda pouco representativa para solos de clima tropical. Alguns filos não foram detectados nas áreas reflorestadas (*Planctomycetes* e *Verrucomicrobia*), no entanto, à presença ou ausência de determinados filos em cada área não pode ser completamente associada às intervenções (humanas e naturais) sem o monitoramento dessa diversidade ao longo do tempo.

O estudo permitiu verificar uma maior biomassa bacteriana em relação a biomassa fúngica nos solos das três áreas, através do perfil de PLFAs, o que pode estar associado a uma condição específica do ecossistema araucária, ou reflexo do tipo de material vegetal encontrado nas áreas. Alguns atributos químicos do solo podem estar influenciando a diversidade de microrganismos destas áreas como visto pelas análises multivariadas, sendo o pH o atributo que mais se relacionou às diferentes medidas microbianas realizadas nas áreas. A importância da utilização das diferentes ferramentas de análises multivariadas (ACD, ACP, NMDS, ANOSIM e AC) para o presente estudo, sugere uma maior utilização das mesmas para estudos microbianos, através de medidas tradicionais ou moleculares, melhorando a resposta e exploração do conjunto de dados, e obtendo uma melhor interpretação do comportamento ecológico encontrado.

3 CONCLUSÕES

- A estrutura das comunidades de *Bacteria* no solo das áreas de FN, RF e RQ apesar de serem distintas entre si, foi observado que a área RQ é uma condição intermediária entre FN e RF, mais próxima da condição encontrada na FN.
- Os diferentes estados de conservação das Florestas de Araucária (nativa e reflorestadas) não alteraram a estrutura das comunidades de *Archaea* encontrada nas áreas, devido principalmente a alta variabilidade encontrada entre os pontos.
- A afiliação taxonômica das seqüências de clones do gene rRNA 16S mostrou que o solo das três áreas é diferente quanto ao número de unidades taxonômicas operacionais (UTOs) estimada, e que em FN o número de táxons observados foi maior do que RF e RQ.
- As três áreas apresentaram um grande número de seqüências não afiliadas taxonomicamente, podendo representar novas espécies.
- Uma maior diversidade de UTOs foi encontrada na área de RQ comparativamente a FN, estimada através do índice de diversidade de Shannon (H).
- O seqüenciamento de clones do gene rRNA 16S de *Bacteria* mostrou que embora a diversidade estimada por alguns índices não identifiquem diferenças entre algumas áreas, as comunidades bacterianas encontrada nas três áreas são distintas.
- Os reflorestamentos (RF e RQ) apresentaram maior diversidade de UTOs estimadas do domínio *Bacteria*, porém, suas comunidades microbianas são provavelmente menos funcionais, com maiores valores encontrados para o qCO_2 e menores para o CBM.
- A área de FN embora menos diversa, apresentou maior capacidade de acúmulo de C em sua biomassa (CBM), maior atividade respiratória (C-CO₂) e menor respiração basal (qCO_2), o que reflete numa maior eficiência de sua comunidade microbiana em utilizar o C contido na matéria orgânica do solo para o seu requerimento energético.
- Os diferentes estados de conservação das Florestas de Araucária (nativa e reflorestadas) também influenciaram na capacidade funcional das áreas, com maior capacidade de utilização global de diferentes fontes de substratos de C encontrada na área FN, e com a menor capacidade nos reflorestamentos (RF e RQ).
- Os perfis de PLFAs não permitiu diferenciar das áreas, mas apontou para uma maior proporção relativa de PLFAs bacterianos, principalmente de bactérias Gram-positivas, do que PLFAs fúngicos.

- Os diferentes atributos químicos e microbiológicos foram úteis na interpretação do conjunto dos dados, mostrando uma forte relação entre o pH e o conjunto dos dados biológicos, sugerindo que as estruturas das comunidades microbianas são determinadas principalmente pelo pH do solo.
- A análise canônica discriminante (ACD) separou as áreas estudadas baseada no $q\text{CO}_2$ e teores de Mg e P, e pH.
- As análises multivariadas dos dados foram importantes ferramentas no estudo da diversidade microbiana, detectando mudanças substanciais entre áreas muitas vezes não visualizadas pelo método univariado.

REFERÊNCIAS

- AGNELLI, A.; ASCHER, J.; CORTI, G.; CECCHERINI, M.T.; NANNIPIERI, P.; PIETRAMELLARA, G. Distribution of microbial communities in a forest soil profile investigated by microbial biomass, soil respiration and DGGE of total and extracellular DNA. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 859-868, 2004.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 1463 p.
- ALBUQUERQUE, P.P. **Aspectos ecológicos de populações de fungos micorrízicos arbusculares em reflorestamentos e em mata nativa de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze**. 2003. 61 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2003.
- ALEF, K.; NANNIPIERI, P. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. London: Academic Press, 1995. 576 p.
- ALEXANDER, M. **Introduction to soil microbiology**. New York: John Wiley e Sons, 1977. 472 p.
- ALTIERI, M.A. The ecological role of biodiversity in agroecosystems. **Agriculture Ecosystem Environmental**, Amsterdam, v.74, p.19-31, 1999.
- AMANN, R.I.; LUDWIG, W. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 24, p. 555-565, 2000.
- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 59, p. 143-169, 1995.
- AMATO, M.; LADD, J.N. Studies of nitrogen immobilization and mineralization in calcareous soils. V. Formation and distribution of isotope-labelled biomass during decomposition of ¹⁴C and ¹⁵N-labelled plant material. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 12, p. 405-411, 1980.
- ANDERSON, T.H. Physiological analysis of microbial communities in soil: applications and limitations. In: RITZ, K.D.; GILLER, K.E. (Ed.). **Beyond the biomass**. London: British Society of Soil Science, 1994. p. 67-76.
- _____. Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 98, p. 285-293, 2003.
- ANDERSON, T.H.; DOMSCH, K.H. The metabolic quotient for CO₂ (*q*CO₂) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 25, p. 393-395, 1993.

ANDERSON, T.H.; JOERGENSEN, R.G. Relationship between SIR and FE estimates of microbial biomass C in deciduous forest soils at different pH. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 1033–1042, 1997.

ANDERSSON, S.; INGVAR-NILSSON, S. Influence of pH and temperature on microbial activity, substrate availability of soil-solution bacteria and leaching of dissolved organic carbon in a mor humus. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 1181–1191, 2001.

ARAO, T. In situ detection of changes in soil bacterial and fungal activities by measuring ¹³C incorporation into soil phospholipids fatty acids from ¹³C acetate. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 31, p. 1015 – 1020, 1999.

BÄÄTH, E. Adaptation of soil bacterial communities to prevailing pH in different soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 19, p. 227–237, 1996.

_____. Growth rates of bacterial communities in soils at varying pH: a comparison of the thymidine and leucine incorporation techniques. **Microbial Ecology**, New York, v. 36, p. 316-327, 1998.

BÄÄTH, E.; FROSTEGÅRD, A.O.; PENNANEN, T.; FRITZE, H. Microbial community structure and pH response in relation to soil organic matter quality in wood-ash fertilized, clear-cut or burned coniferous forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 27, p. 229–240, 1995.

BAILEY, V.L.; SMITH, J.L.; BOLTON, H.Jr. Fungal-to-bacterial ratios in soils investigated for enhanced C sequestration. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 34, p. 997-1007, 2002.

BARDGETT, R.D.; HOBBS, H.J.; FROSTGÅRD, Å. Changes in the structure of soil microbial communities following reduction in the intensity of management of an upland grassland. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 22, p. 261–264, 1996.

BARETTA, D. **Fauna do solo e outros atributos edáficos como indicadores de qualidade ambiental em áreas com *Araucaria angustifolia* no Estado de São Paulo**. 2007. 158 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

BARETTA, D.; SANTOS, J.C.P.; FIGUEIREDO, S.R.; KLAUBERG-FILHO, O. Efeito do monocultivo de pinus e da queima do campo nativo em atributos biológicos do solo no planalto sul catarinense. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 29, p. 715-724, 2005.

BARETTA, D.; SANTOS, J.C.P.; MANFROI, A.F.; TASCA, F.A.; DOMINGOS, M.D.; KLAUBERG-FILHO, O.; MAFRA, A.L. Diversidade da fauna edáfica em mata nativa, floresta de pinus e campo nativo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 29, 2003, Ribeirão Preto. **Resumos...** Ribeirão Preto: SBCS/UNESP, 2003. p. 1-4.

BARNS, S. M.; TAKALA, S.L.; KUSKE, C.R. Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom *Acidobacterium* in the environment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 1731–1737, 1999.

BÉLENGER, N.; CÔTÉ, B.; FYLES, J.W.; COURCHESNE, F.; HENDERSHOT, W.H. Forest regrowth as the controlling factor of soil nutrient availability 75 years after fire in a deciduous forest of Southern Quebec. **Plant and Soil**, The Hague, v. 262, p. 363-372, 2004.

BENDING, G. D.; TURNER, M. K.; RAYNS, F.; MARX, M.C.; WOOD, M. Microbial and biochemical soil quality indicators and their potential for differentiating areas under contrasting agricultural management regimes. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 785-1792, 2004.

BERTOL, I.; COGO, N.P.; LEVIEN, R. Erosão hídrica em diferentes preparos do solo após as colheitas de milho e trigo, na presença e ausência dos resíduos culturais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 21, p. 409-418, 1997.

BERZAGHI, A.J.P. **Dinâmica da serapilheira na mata de *Araucaria* e *Podocarpus* do Parque Estadual de Campos do Jordão, SP**. 1994. 118p. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.

BIOLOG. **GN microplate instructions for use**. Hayward: Biolog Inc., 1993.

BIOTA/FAPESP. Biodiversidade vegetal e de organismos edáficos em ecossistemas de *Araucaria angustifolia* naturais e impactados no Estado de São Paulo. 2004. Disponível em: <<http://www.solos.esalq.usp.br/biota/biotacapa.html>>. Acesso em: 20 ago. 2004.

BJORNDOTTIR, S.H.; BLONDAL, T.; HREGGVIDDSSON, G.O.; EGGERTSSON G.; PETURSDOTTIR, S.; HJORLEIFSDOTTIR, S.; THORBJARNARDOTTIR, S.H.; KRISTJANSSON, J.K. *Rhodothermus marinus*: physiology and molecular biology. **Extremophiles**, Tokyo, v. 10, p. 1-16, 2006.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, p. 911–917, 1959.

BLUM, H.E.H. Ecologia de *Araucaria angustifolia* e futuras condições de reflorestamento no sul do Brasil. **Brasil Madeira**, Curitiba, v. 7, p. 10-12, 1977.

_____. Ecophysiological and phylogenetic aspects of *Araucariaceae* with special consideration of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. In: IUFRO MEETING ON FORESTRY PROBLEMS OF THE GENUS ARAUCARIA, 1, 1980, Curitiba. **Forestry problems of the genus *Araucaria***. Curitiba: FUPEF, 1980. p. 71-74.

BOHANNAN, B. J. M.; HUGHES, J. New approaches to analyzing microbial biodiversity data. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 6, p. 282–287, 2003.

- BONDE, T.A.; SCHNURER, J.; ROSSWALL, T. Microbial biomass as a fraction of potentially mineralisable nitrogen in soils from a long-term experiment. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 20, p. 447-452, 1988.
- BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W.; GARRITY, G. M. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed. New York: Springer, 2001. v. 1, p. 359-367.
- 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**, Washington, v. 63, p. 2647-2653, 1997.
- BORNEMAN, J.; SKROCH, P.W.; O'SULLIVAN, K.M.; PALUS, J.A.; RUMJANEK, N.G.; JANSEN, J.L.; NIENHUIS, J.; TRIPLETT, E. W. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 1935-1943, 1996.
- BOSSIO, D.A.; SCOW, K.M. Impact of carbon and flooding on the metabolic diversity of microbial communities in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 4043-4050, 1995.
- BOWEN, G. D.; BEVEGE, D. I.; MOSSE, B. Phosphate physiology of vesicular-arbuscular mycorrhizas. In: SANDERS, F. E. (Ed.). **Endomycorrhizas**. London: Academic Press, 1975. p. 437-446.
- BOWEN, G. D.; SKINNER, M. F.; BEVEGE, D. I. Zinc uptake by mycorrhizal and uninfected roots of *Pinus radiata* and *Araucaria cunninghamii*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 6, p. 141-144, 1974.
- BRASIL. Portaria n. 06-N, de 15 de janeiro de 1992. Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção. **Diário Oficial**. Brasília, 23 jan. 1992. p. 870-872.
- BRINKLEY, D.; RICHTER, D.; DAVID, M.B.; CALDWELL, B. Soil chemistry in a loblolly/longleaf pine forest with interval burning. **Ecological applications: a publication of the Ecological Society of America**, Washington, v. 2, p. 157-164, 1994.
- BRUSSARD, L.; KUYPER, T. W.; DIDDEN, W. A. M.; DE GOEDE, R. G. M.; BLOEM, J. Biological soil quality from biomass to biodiversity— Importance and resilience to management stress and disturbance. In: SCHJØNNING, P.; ELMHOLT, S.; CHRISTENSEN, B. T. (Ed.) **Challenges in modern agriculture**. Wallingford: CABI, 2004. p. 139-161.
- BUCHER, A. E.; LANYON, L. E. Evaluating soil management with microbial community-level physiological profiles. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 29, p. 59-71, 2005.
- BUNNEY, S. Prehistoric farming caused devastating soil erosion. **New Scientist**, London, v. 125, p. 1705-1720, 1990.

- CADILLO-QUIROZ, H.; BRAUER, S.; YASHIRO, E.; SUN, C.; YAVITT, J.; ZINDER, S. Vertical profiles of methanogenesis and methanogens in two contrasting acidic peatlands in central New York State, USA. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 8, p. 1428-1440, 2006.
- CALHÔA, C. **Microbial communities in Mediterranean soil**: assessment of the enzymatic activity and functional diversity along a soil management gradient in Cork-oak forest. 2003. 50 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Universidade de Coimbra, Coimbra, 2003.
- CAMPBELL, C.D.; GRAYSTON, S.J.; HIRST, D.J. Use of rhizosphere carbon sources in sole carbon source tests to discriminate soil microbial communities. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 30, p. 33-41, 1997.
- CANHOS, V.P.; MANFIO, G.P.; VAZOLLER, R.F.; PELLIZARI, V.H. Diversidade no domínio bactéria. In: BRITO, M.C.W.; JOLY, C.A. (Eds.). **Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil**: síntese do conhecimento ao final do século. São Paulo: Fapesp, 1997. p. 1-9.
- CARBALLAS, M. Los incendios forestales. In: XUNTA DE GALICIA. **Reflexiones sobre el medio ambiente en Galicia**. Santiago de Compostela: Xunta de Galicia, 2003. p. 362-415/545-547.
- CARBALLAS, M; ACEA, M.J.; CABANEIRO, A.; TRASAR, C.; VILLAR, M.C.; DÍAZ-RAVIÑA, M.; FERNÁNDEZ, I.; PRIETO, A.; SAÁ, A.; VÁZQUEZ, F.J.; ZEHNER, R.; CARBALLAS, T. Organic matter, nitrogen, phosphorus and microbial population evolution in forest humiferous acid soils after wildfires. In: TRABAUD, L.; PRODON, R. (Ed.). **Fire in mediterranean ecosystems**. Brussels: Commission of the European Communities, 1994. p. 379-385. (Ecosystems Research Series, 5).
- CARDOSO, A.M.; CLEMENTINO, M.B.M.; MARTINS, O.B.; VIEIRA, R.P.; ALMEIDA, R.V.; ALQUERES, S.M.C.; ALMEIDA, W.I. Archaea: potencial biotecnológico. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 30, p. 71-77, 2003.
- CARNEIRO, M.A.C. **Características bioquímicas do solo em duas cronosseqüências de reabilitação em áreas de mineralização de bauxita**. 2000. 166 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.
- CARVALHO, F. de. **Atributos bioquímicos como indicadores da qualidade de solo em florestas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. no estado de São Paulo**. 2005. 95 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras**: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Colombo: EMBRAPA-CNPq-SPI, 1994. 640 p.
- CASSOL, C.A. **Relações entre características do solo, crescimento e produtividade em povoamento implantado de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. em Passo Fundo-RS**. 1982. 83 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1982.

CATTELAN, A.J. **Sistemas de culturas e os microorganismos do solo**. 1989. 150 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1989. 150p.

CAVALIER-SMITH, T. The neomuran origin of archaeobacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 1, p. 52–76, 2002.

CERRI, C.C.; VOLKOFF, B.; EDUARDO, B.P. Efeito do desmatamento sobre a biomassa microbiana em Latossolo Amarelo da Amazônia. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 9, p. 1-4, 1985.

CHARENTREUIL, C.; GIRAUD, E.; PRIN, Y.; LORQUIN, J.; BA, A.; GILLIS, M.; LAJUDIE, P.; DREYFUS, B. Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 5437–5447, 2000.

CHAO, A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. **Scandinavian Journal of Statistics**, Oslo, v. 11, p. 265-270, 1984.

_____. Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. **Biometrics**, Washington, v. 43, p. 783-791, 1987.

CHAO, A.; LEE, S. M. Estimating the number of classes via sample coverage. **Journal of the American Statistical Association**, Alexandria, v. 87, p. 210–217. 1992.

CHAO, A.; MA, M-C.; YANG, M. C. K. Stopping rule and estimation for recapture debugging with unequal detection rates. **Biometrika**, London, v. 80, p. 193-201, 1993.

CHAO, A.; SHEN, T.J.; HWANG, W. Application of laplace's boundary-mode approximations to estimate species and shared species richness. **Australian and New Zealand Journal of Statistics**, Melbourne, v. 48, p. 117–128, 2006.

CHISTOSERDOVA, L.; JENKINS, C.; KALYUZNAYA, M.G.; MARX, C.J.; LAPIDUS, A.; VORHOLT, J.A.; STALEY, J.T.; LINDSTROM, M.E. The enigmatic Plactomycetes may hold a key to the origins of methanogenesis and methylotrophy. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 21, p. 1234-1241, 2004.

CHOW, M.L.; RADOMSKI, C.C.; McDERMOTT, J.M.; DAVIES, J.; AXELROOD, P.E. Molecular characterization of bacterial diversity in Lodgepole pine (*Pinus contorta*) rhizosphere soils from British Columbia forest soils differing in disturbance and geographic source. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 42, p. 347-357, 2002.

CHUNG, H.; PARK, M.; MADHAIYAN, M.; SESHADRI, S.; SONG, J.; CHO, H.; SA, T. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 37, p. 1970–1974, 2005.

- 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. Nutrient additions to a tropical rain forest drive substantial soil carbon dioxide losses to the atmosphere. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, p. 10316–10321, 2006.
- CLEVELAND, C.C.; TOWNSEND, A.R.; SCHMIDT, S.K. Phosphorus limitation of microbial processes in moist tropical forests: Evidence from short-term laboratory incubations and field experiments. **Ecosystems**, New York, v. 5, p. 680–691, 2002.
- CLEVELAND, C.C.; NEMERGUT, D.R.; SCHMIDT, S.K.; TOWNSEND, A.R. Increases in soil respiration following labile carbon additions linked to rapid shifts in soil microbial community composition. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v.82, p.229-240, 2007.
- COHAN, F. What are bacterial species? **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 56, p. 457-487, 2002.
- CORREIA, M.E.F.; ANDRADE, A.G. Formação da serapilheira e ciclagem de nutrientes. In: SANTOS, G.A.; CAMARGO, F.A.O. (Ed.). **Fundamentos da matéria orgânica do solo - Ecosistemas tropicais e subtropicais**. Porto Alegre: Genesis, 1999. p. 197-226.
- COSTA, D. **Effects of land use management on soil microbial communities from Portuguese Monstados**. 2006. 99 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Universidade de Coimbra, Coimbra, 2006.
- COUTINHO, L.M. O cerrado e a ecologia do fogo. **Ciência Hoje**, Brasília, v. 12, p. 22-30, 1990.
- CRUZ-CASTILLO, J.G.; GANESHANANDAM, S.; MACKAY, B.R.; LAWES, G.S.; LAWOKO, C.R.O.O.; WOOLLEY, D.J. Applications of canonical discriminant analysis in horticultural research. **HortScience**, Alexandria, v. 29, p. 1115-1119, 1994.
- CUMMINGS, M.P.; HANDLEY, S.A.; MYERS, D.S.; REED, D.L.; ROKAS, A.; WINKA, K. Comparing bootstrap and posterior probability values in the four-taxon case. **Systematic Biology**, Washington, v. 52, p. 477–487, 2003.
- CURL, E.A.; TRUELOVE, B. **The rhizosphere**. New York: Springer-Verlag, 1986. 288 p.
- CURTIS, T.P.; SLOAN, W.T. Exploring microbial diversity – a vast below. **Science**, Washington, v. 309, p. 1331-1333, 2005.
- CURTIS, T.P.; NAKATSU, C.H.; KONOPKA, A. Aciduric *Proteobacteria* isolated from pH 2.9 soil. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 178, p. 65–70, 2002.

CURTIS, T.P.; SLOAN, W.T.; SCANNELL, J.C. Estimating prokaryotic diversity and its limits. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, p. 10494–10499, 2002.

CURY, J.C. **Atividade microbiana e diversidades metabólica e genética do solo de mangue contaminado com petróleo**. 2002. 84 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

_____. **Diversidade de *Bacteria* e *Archaea* em solos de mangue e marisma**. 2006. 147 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

DALAL, R.C. Soil microbial biomass – What do the numbers really mean? **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v. 38, p. 649-665, 1998.

DALAL, R.C.; HENDERSON, P.A.; GLASBY, J.M. Organic matter and microbial biomass in vertisol after 20 yr of zero tillage. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 23, p. 435-441, 1991.

De BOER, W.; KESTER, R.A. Variability of nitrification potentials in patches of undergrowth vegetation in primary scots pine stands. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 86, p. 97-103, 1996.

De LONG, E. F.; PACE, N. A. Environmental diversity of bacteria and archaea. **Systematic Biology**, Washington, v. 50, p. 470-478, 2001.

DERRY, A.M.; STADDON, W.J.; KEVAN, P.G.; TREVORS, J.T. Functional diversity and community structure of micro-organisms in three arctic soils as determined by sole-carbon-source-utilization. **Biodiversity and Conservation**, Dordrecht, v. 8, p. 205-221-1999.

DHILLON, A.; TESKE, A.; DILLON, J.; STAHL, D.A.; SOGIN, M.L. Molecular Characterization of Sulfate-Reducing Bacteria in the Guaymas Basin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 2765–2772, 2003.

DÍAZ-RAVIÑA, M.; BÅÅTH, E.; MARTÍN, A.; CARBALLAS, T. Microbial community structure in forest soils treated with a fire retardant. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 42, p. 465-472, 2006.

DÍAZ-RAVIÑA, M.; PRIETO, A.; CARBALLAS, T. Fumigation–extraction method to estimate microbial biomass in heated soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 24, p. 259–264, 1992.

DiGIOVANNI, G.; WIDMAR, F.; SEIDLER, R.J.; WATRUD, L.S. Molecular analysis of diversity represented by a metabolic culture assay of a soil microbial community. In: GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, 97, Miami Beach. **Resumos...** Miami Beach: American Society for Microbiology, 1997.

- DINESH, R.; GHOSHAL CHAUDHURI, S.; GANESHAMURTHY, A.N.; DEY, C. Changes in soil microbial indices and their relationships following deforestation and cultivation in wet tropical forests. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 24, p. 17–26, 2003.
- DOBRANIC, J.K.; ZAK, J.C. A microtiter plate procedure for evaluating fungal functional diversity. **Mycologia**, New York, v. 91, p. 756-765, 1999.
- DODD, J.C.; BODDINGTON, C.L.; RODRIGUEZ, A.; GONZALES-CHAVES, C.; MANSUR, I. Mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) from different genera: form, function and detection. **Plant and Soil**, The Hague, v. 226, p. 131-151, 2000.
- DOJKA, M. A.; HARRIS, J.K.; PACE, N.R. Expanding the known diversity and environmental distribution of an uncultured phylogenetic division of bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 1617–1621, 2000.
- DUNBAR, J.; BARNS, S.M.; TICKNOR, L.O.; KUSKE, C.R. 2002. Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 3035–3045, 2002.
- EDWARDS, I.P.; BURGMANN, H.; MINIACI, C.; ZEYER, J. Variation in microbial community composition and culturability in the rhizosphere of *Leucanthesopsis alpina* (L) heywood and adjacent bare soil along an alpine chronosequence. **Microbial Ecology**, New York, v. 52, p. 679–692, 2006.
- EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília, 1999. 412 p.
- EWING, B.; GREEN, P. Base-calling automated sequencer traces using phred. II Erros probabilities. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 186-194, 1998.
- FANG, J.; CHAN, O.; KATO, C.; SATO, T.; PEEPLES, T.; NIGGEMEYER, K. **Phospholipid fatty acids of deep-sea pressure-loving bacteria**: correlation with phylogeny and piezophily. Disponível em: < http://www.ia.spacegrant.org/RES_INF/VRR2002/FangCOOP.pdf >. Acesso em: 5 de nov. 2007.
- FAORO, H. **Determinação da biodiversidade de Archaea e Bacteria da Mata Atlântica Paranaense**. 2006. 183 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Bioquímicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- FEDERLE, T.W. Microbial distribution in the soil—new techniques, In: MEGUSAR, F.; GANTAR, M. (Ed.). **Perspectives in Microbial Ecology**. Ljubljana: Slovene Society for Microbiology, 1986. p. 493–498.
- FEIGL, B.J.; CERRI, C.C.; BERNOUX, M. Balanço de carbono e biomassa microbiana em solos da Amazônia In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p. 423-441.

FELSESTEIN, J.P. **Phylogenetic Inference Package** (version 3.5c). Seattle: University Washington, 1993.

FELSKE, A.; WOLTERINK, A.; Van LIS, R.; AKKERMANS, AD.L. Phylogeny of the main bacterial 16S rRNA sequences in Drentse A grassland soils (The Netherlands). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 871–879, 1998.

FERNANDES, A. V.; BACKES, A. Produtividade primária em floresta com *Araucaria angustifolia* no Rio Grande do Sul. **Iheringia – Série Botânica**, Porto Alegre, v. 51, p. 63-78, 1998.

FIALHO, J.F.; BORGES, H.C.; BARROS, N.F. Cobertura vegetal e as características químicas e físicas e atividade da microbiota de um Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 15, p. 21-28, 1991.

FIERER, N.; BRADFORD, M.A.; JACKSON, R.B. Towards an ecological classification of soil bacteria. **Ecology**, Washington, v. 88, p. 1354-1364, 2007.

FILION, M.; ST-ARANAUD, M.; FORTIN, J.A. Direct interaction between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and different rhizosphere microorganisms. **New Phytology**, Amsterdam, v. 141, p. 525-533, 1999.

FORTERRE, P. *Archaea*: what can we learn from their sequences? **Current Opinion in Genetics and Development**, London, v. 7, p. 764-770, 1997.

FRANÇA, J.T.; POGGIANI, F. Variação do microclima em áreas com diferentes idades de sucessão secundária na Floresta Nacional do Jamari – RO. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 3, 1996, Brasília, 1996. **Resumos...** Brasília: Universidade de Brasília, 1996. p. 422.

FRANCO, A.A.; FARIA, S.M. The contribution of N₂-fixing tree legumes to le recalcation and sustainability in the tropics. **Soil Biology and Biochemistry**, London, v. 29, p. 897-903, 1997.

FROSTEGÅRD, Å.; BÁÁTH, E. The use phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 22, p. 59-65, 1996.

FUERST, J. A. Intracellular compartmentation in planctomycetes. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 59, p. 299–328, 2005.

GAASTERLAND, T. Archaeal genomics. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 2, p. 542-547, 1999.

GALAND, P.E.; FRITZE, H.; CONRAD, R.; YRJALA, K. Pathways for methanogenesis and diversity of methanogenic *Archaea* in three boreal peatland ecosystems. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 2195-2198, 2005.

- GAMA-RODRIGUES, E.F. Biomassa microbiana e ciclagem de nutrientes. In: SANTOS, G.A.; CAMARGO, F.A.O. (Ed.). **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais**. Porto Alegre: Genesis, 1999. p. 227-244.
- GAMA-RODRIGUES, E.F.; GAMA-RODRIGUES, A.C.; BARROS, N.F. Biomassa microbiana de carbono e de nitrogênio de solos sob diferentes coberturas florestais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 21, p. 361-365, 1997.
- GAO, B.; GUPTA, R.S. Conserved indels in protein sequences that are characteristic of the phylum Actinobacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 55, p. 2401-2412, 2005.
- GARLAND, J.L. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 24, p. 289-300, 1997.
- GARLAND, J.L.; MILLS, A.L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 2351-2359, 1991.
- GARRITY, G.M.; BELL, J.A.; LILBURN, T.G. Taxonomic outline of the *Prokaryotes*. **Bergey's manual of systematic bacteriology**, 2nd ed. Release 5.0. New York: Springer, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline>>. Acesso em: 15 out. 2007.
- GARRITY, G.M.; HOLT, J.H. The road map to the manual. In: BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, G.M.; GARRITY. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2nd ed., Berlin: Springer-Verlag KG, 2001. p. 119-166.
- 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**, Amsterdam, v. 38, p. 1-15, 1999.
- GEVERS, P.; COHAN, F.M.; LAWRENCE, J.G.; SPRATT, B.G.; COENT, T.; FEIL, E.J.; STACKEBRANDT, E.; Van PEER, Y.; VANDAMME, P.; THOMPSON, F.L.; SWINGS, J. Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, p. 1733-1739, 2005.
- GILLER, K.E.; BEARE, M.H., LAVELLE, P.; IZAC, A.M.N.; SWIFT, M.J. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 6, p. 3-16, 1997.
- GLIESSMAN, S.R. **Agroecologia: processos ecológicos em agricultura sustentável**. 2 ed., Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 2001. 653 p.

GLOCKNER, F.O.; KUBE, M.; BAUER, M.; TEELING, H.; LOMBARDOT, T.; LUDWIG, W.; GADE, D.; BECK, A.; BORZYM, K.; HEITMANN, K.; RABUS, R.; SCHLESNER, H.; AMANN, R.; REINHARDT, R. Complete genome sequence of the marine planctomycete *Pirellula* sp. Strain 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, p. 8298-8303, 2003.

GLOVER, J.D.; REGANOLD, J.P.; ANDREWS, P.K. Systematic method for rating soil quality of conventional, organic, and integrated apple orchards in Washington State. **Applied Soil Ecology: a section of Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 80, p. 29-45, 2000.

GOBERNA, M.; INSAM, H.; KLAMMER, S.; PASCUL, J. A.; SANCHEZ, J. Microbial community structure at different depths in disturbed and undisturbed semiarid Mediterranean forest soils. **Microbial Ecology**, New York, v. 50, p. 315-326, 2005

GOLFARI, L. Coníferas aptas para repoblaciones forestales en el Estado de São Paulo. **Silvicultura em São Paulo**, São Paulo, v. 6, p. 7-62, 1967.

GOLFARI, L.; CASER, R. L.; MOURA, V. P. G. **Zoneamento ecológico esquemático para o reflorestamento no Brasil: 2ª aproximação**. Belo Horizonte: Centro de Pesquisa Florestal da Região do Cerrado, PRODEPEF, 1978. 66 p. (Série Técnica, 11).

GOMES, E.; FERRERAS, L.; TORESANI, S. Soil bacterial functional diversity as influenced by organic amendment application. **Bioresource Technology**, New York, v. 97, p. 1484-1489, 2006.

GOMES, N.C.M.; HEUER, H.; SCHÖNFELD, J.; COSTA R.; MENDONCA-HAGLER, L.; SMALLA, K. Bacterial diversity of rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. **Plant and Soil**, The Hague, v. 232, p. 167-180, 2001.

GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S.T. Ecology of actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 37, p. 189-216, 1983.

GRAYSTON, S.J.; PRESCOTT, C.E. Microbial communities in forest floors under four tree species in coastal British Columbia. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 37, p. 1157-1167, 2005.

GRAYSTON, S.J.; RENNENBERG, H. Assessing effects of forest management on microbial community structure in a central European beech forest. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 36, p. 2595-2604, 2006.

GRAYSTON, S.J.; GRIFFITH, G.S.; MAWDSLEY, J.L.; CAMPBELL, C.D.; BARDGETT, R.D. Accounting for variability in soil microbial communities of temperate upland grassland ecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 533-551, 2001.

- GRAYSTON, S.J.; CAMPBELL, C.D.; BARDGETT, R.D.; MAWDSLEY, J.L.; MAWDSLEY-CLEGG, C.D.; RITZ, K.; GRIFFITHS, B.S.; RODWELL, J.S.; EDWARDS, S.J.; DAVIES, W.J.; ELSTON, D.J.; MILLARD, P. Assessing shifts in microbial community structure across a range of grasslands of differing management intensity using CLPP, PLFA and community DNA techniques. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 25, p. 63–84, 2003.
- GRIFFITHS, B.S., RITZ, K., WHEATLEY, R.; KUAN, H.L.; BOAG, B.; CHRISTENSEN, S.; EKELUND, F., SØRENSEN, S.J., MÜLLER, S.; BLOEM, J.E. An examination of the biodiversity-ecosystem function relationship in arable soil microbial communities. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 90, p. 279–294, 2000.
- GRIFFITHS, B.S.; RITZ, K.; BARDGETT, R.D.; COOK, R.; CHRISTENSEN, S.; EKELUND, F.; SØRENSEN, S.J.; BÅÅTH, E.; BLOEM, J.; DE RUITER, P.C.; DOLFING, J.; NICOLARDOT, B. Ecosystem response of pasture soil communities to fumigation-induced microbial diversity reductions: an examination of the biodiversity–ecosystem function relationship. **Oikos**, Blackwell, v. 90, p. 279–294, 2001.
- GUCKERT, J.B.; HOOD, M.A.; WHITE, D.C. Phospholipid esterlinked fatty acid profile changes during nutrient deprivation of *Vibrio cholerae*: increases in the trans/cis ratio and proportions of cyclopropyl fatty acids. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 52, p. 794–801, 1986.
- GURGEL FILHO, O.A. Silvicultura da *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Kuntze. In: IUFRO MEETING ON FORESTRY PROBLEMS OF THE GENUS ARAUCARIA, 1., 1979, Curitiba. **Forestry problems of the genus Araucaria**. Curitiba: FUPEF, 1980. p. 29-68.
- HAACK, S.H.; GARCHOW, H.; ODELSON, D.A.; FORNEY, L.J.; KLUG, M.J. Accuracy, reproducibility, and interpretation of fatty acid methyl ester profiles of model bacterial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 2483–2493, 1994.
- HACKL, E.; PFEFFER, M.; DONAT, C.; BACHMANN, G.; ZECHMEISTER-BOLTENSTERN, S. Composition of the microbial communities in the mineral soil under different types of natural forest. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.37, p. 661-671, 2005.
- HACKL, E.; ZECHMEISTER-BOLTENSTERN, S.; BODROSSY, L.; SESSITSCH, A. Comparison of diversities and compositions of bacterial populations inhabiting natural forest soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 5057–5065, 2004.
- HAMAMURA, N.; OLSON, S.H.; WARD, D.M.; INSKEEP, W.P. Diversity and functional analysis of bacterial communities associated with natural hydrocarbon seeps in acidic soils at rainbow springs, Yellowstone National Park. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 5943-5950, 2005.
- HARTMANN, M.; WIDMER, F. Community structure are more sensitive to differences in soil bacterial communities than anonymous diversity indices. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 7804–7812, 2006.

- HAVLIN, J.L.; TISDALE, S.L.; BEATON, J.D.; NELSON, W.L. **Soil fertility and fertilizers: an introduction to nutrient management**. New Jersey: Pearson Prentice Hall, 2005. 515 p.
- HEAD, I. M.; SAUNDERS, J. R.; PICKUP, R. W. Microbial evolution, diversity and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microbial Ecology**, New York, v. 35, p. 1–21, 1998.
- HEDLUND, B.P.; GOSINK, J.J.; STALEY, J.T. Verrucomicrobia a new division of the *Bacteria* containing three new species of Prosthecobacter. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 72, p. 29-38, 1997.
- HEIPIEPER, H.J.; MEULENBELD, G.; Van OIRCHOT, Q.; DE BONT, A.A. Effect of environmental factors on the trans/cis ratio of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* S12. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 2773–2777, 1996.
- HENCKEL, T., JÄCKEL, U., SCHNELL, S., CONRAD, R. Molecular analyses of novel methanotrophic communities in forest soil that oxidize atmospheric methane. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 1801–1808, 2000.
- HENRICI, A.T.; JOHNSON, D.C. Studies of Freshwater Bacteria: II. Stalked Bacteria, a New Order of *Schizomycetes*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 30, p. 61-93, 1935.
- HERINGER, I.; JACQUES, A.V.A. Características de um Latossolo Vermelho sob pastagem natural sujeita à ação prolongada do fogo e de práticas alternativas de manejo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, p. 309-314, 2002.
- HERRERA, R.; JORDAN, C.F.; KLINGE, H.; MEDINA, E. Amazon ecosystems. Their structure and functioning with particular emphasis on nutrients. **Interciência**, Caracas, v. 3, n. 4, p. 223-232, 1978.
- HIRASHI, A.; UEDA, Y. Rhodoplanes gen. nov., a new genus of phototrophic bacteria including *Rhodopseudomonas rosea* as *Rhodoplanes roseus* comb. nov. and *Rhodoplanes elegans* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 44, p. 665-673, 1994.
- HIRASHI, A.; KISHIMOTO, N.; KOZAKO, Y. Phylogenetic position of the menaquinone-containing acidophilic chemo organotroph *Acidobacterium capsulatum*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 132, p. 91-94, 1995.
- HOOGH, R.J. de; DIETRICH, A. B. Avaliação de sítio para *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze em povoamentos artificiais. **Brasil Florestal**, Brasília, v. 10, p. 19-92, 1979.
- HOPPE, J.M.; CALDEIRA, M.V.W. Correlações entre o crescimento de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, plantada na floresta nacional de Passo Fundo, RS com as características químicas do solo. **Revista Acadêmica**, Curitiba, v. 1, p. 33-40, 2003.
- HOROWITZ, N.H.; CAMERON, R.E.; HUBBARD, J.S. Microbiology of the dry valleys of Antarctica. **Science**, London, v. 176, p. 242-245, 1972.

- HUECK, K. Distribuição e habitat natural do pinheiro do Paraná (*Araucaria angustifolia*). **Botânica: Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras**, São Paulo, n. 156, p. 5-24, 1953.
- HUGENHOLTZ, P. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. **Genome Biology**, London, v. 3, p. 1-8, 2002.
- HUGENHOLTZ, P.; PACE, N. R. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 14, p. 190-197, 1996.
- HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B. M.; PACE, N. R. Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 180, p. 4765–4774. 1998.
- IBEKWE, A.M.; KENNEDY, A.C. Phospholipid fatty acid profiles and carbon utilization patterns for analysis of microbial community structure under field and greenhouse conditions. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 26, p. 151-163, 1998.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Manual técnico da vegetação brasileira**. Rio de Janeiro, 1992. 92 p. (IBGE. Série Manuais Técnicos em Geociências, 1).
- INSAM, H. A new set of substrates proposed for community characterization in environmental samples. In: INSAM, H.; RANGGER, A. (Ed.). **Microbial Communities: Functional versus structural approaches**. Heidelberg: Springer, p. 259–260, 1997.
- INSAM, H.; RANGGER, A.; HENRICH, M.; HITZL, W. The effect of grazing on soil microbial biomass and community on alpine pastures. **Phyton**, Buenos Aires, v. 36, p. 205-216, 1996.
- JAATINEM, K.; KNIEF, C.; DUNFIELD, P.F.; YRJÄLÄ, K.; FRITZE, H. Methanotrophic bacterial in boreal forest soil after fire. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 50, p. 195-202, 2004.
- JACQUES, A.V.A. A queima das pastagens naturais – efeitos sobre o solo e a vegetação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, p. 177-181, 2002.
- JANSSEN, P.H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 1719–1728, 2006.
- JANSSEN, P. H.; YATES, P.S.; GRINTON, B.E.; TAYLOR, P.M.; SAIT, M. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 2391–2396, 2002.
- JENKINSON, D.S.; LADD, J.N. Microbial biomass in soil: Measurement and turnover. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 5, p. 415-471, 1981.

- JOHNSON, C.E.; JOHNSON, A.H.; HUNTINGTON, T.G.; SICCAM, T.G. Whole-tree clear-cutting effects on soil horizons and organic-matter pools. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 55, p. 497-502, 1991.
- JOHNSON, D.; LEAKE, J. R.; LEE, J. A.; CAMPBELL, C. D. Changes in soil microbial biomass and microbial activities in response to 7 years stimulated pollutant nitrogen deposition on a heathland and two grasslands. **Environmental Pollution**, Barking, v. 103, p. 239-250, 1998.
- JOLY, A.B. **Botânica**: chaves de identificação das famílias de plantas vasculares que ocorrem no Brasil. São Paulo: Editora Nacional, 1977. 159 p.
- JORDAN, C.F. **Amazonian rainforests**: ecosystem disturbance and recovery. New York: Springer-Verlag, 1987. 133 p.
- KANDELER, E.; KAMPICHLER, C.; HORAK, O. Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 23, p. 299-306, 1996.
- 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.
- KENNEDY, A.C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, ecosystems and Environmental**, Amsterdam, v. 74, p. 145-156, 2003.
- KENNEDY, A.C.; SMITH, K.L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. **Plant and Soil**, The Hague, v. 170, p. 75-86, 1995.
- KENT, A.D.; YANNARELL, A.C.; RUSAK, J.A.; TRIPLETT, E.W.; McMAHON, K.D. Synchrony in aquatic microbial community dynamics. **The ISME Journal**: multidisciplinary journal of microbial ecology / International society for microbial ecology (ISME), New York, v. 1, p. 38-47, 2007.
- KHATOUNIAN, C.A. **A reconstrução ecológica da agricultura**. Botucatu: Agroecológica, 2001. 348 p.
- KILLHAM, K. **Soil ecology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1994, 242 p.
- KIM, J. S.; SPAROVEK, G.; LONGO, R.M.; DeMELO, W.J.; CROWLEY, D. Bacterial diversity of terra preta and pristine forest soil from the Western Amazon. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 684-690, 2007.
- KIRK, J.L.; BEAUDETTE, L.A; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J.N.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 58, p. 169-188, 2004.

KITAGAWA, W.; TAKAMI, S.; MIYAUCHI, K.; MASAI, E.; KAMAGATA, Y.; TIEDJE, J.M.; FUKUDA, M. Novel 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation genes from oligotrophic Bradyrhizobium sp. strain HW13 isolated from a pristine environment. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 184, p. 509–518, 2002.

KLEIN, R. M. O aspecto dinâmico do pinheiro brasileiro. **Sellowia**, Itajaí, v. 12, p. 17-44, 1960.

KOLB, S.; KNIEF, C.; DUNFIELD, P.F.; CONRAD, R. Abundance and activity of uncultured methanotrophic bacteria involved in the consumption of atmospheric methane in two forest soils. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 7, p. 1150–1161, 2005.

KOTSYURBENKO, O.R.; CHIN, K.; GLAGOLEV, M.V.; STUBNER, S.; SIMANKOVA, M.V.; NOZHEVNIKOVA, A.N.; CONRAD, R. Acetoclastic and hydrogenotrophic methane production and methanogenic populations in an acidic west-siberian peat bog. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 6, p. 1159-1173, 2004.

KUHNER, C.H.; MATTHIES, C. *Clostridium akagii* sp. nov. and *Clostridium acidisoli* sp. nov.: acid-tolerant, N(2)-fixing clostridia isolated from acidic forest soil and litter. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 50, p. 873-881, 2000.

KURZ, W.F.W.; LaRUE, T.A. Nitrogenase activity in rhizobia in absence of plant host. **Nature**, London, v. 256, p. 407–408, 1975.

LA BASTIDE, J. G. A.; Van GOOR, C. P. Growth/site relationships in plantations of *Pinus elliottii* and *Araucaria angustifolia* in Brazil. **Plant and Soil**, The Hague, v. 32, p. 349-366, 1970.

LADD, J.N.; OADES, J.M.; AMATO, M. Microbial biomass formed from ¹⁴C, ¹⁵N-labelled plant material decomposing in soils in the field. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 13, p. 114-126, 1981.

LAL, R. **Métodos para a avaliação do uso sustentável dos recursos solo e água nos trópicos**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1999. 97 p.

LAMBAIS, M.R.; CURY, J.C.; MALUCHE-BARETTA, C.R.D.; BÜLL, R.C. Diversidade Microbiana nos Solos: Definindo Novos Paradigmas. In: VIDAL-TORRADO, P.; ALLEONI, L.R.F.; COOPER, M.; SILVA, A.P. DA; CARDOSO, E.J. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: SBCS, 2005, v. 4, p. 43-84.

LAMMEL, D.R. **Diversidade de rizóbios em florestas de *Araucaria angustifolia* no Estado de São Paulo**. 2007. 117 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

LARKIN, R. Characterization of soil microbial communities under different potato cropping systems by microbial population dynamics, substrate utilization and fatty acid profiles. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 35, p. 1451- 1466, 2003.

LAVERMAN, A.M.; BRASTER, M.; RÖLING, W.F.M.; van VERSEVELD, H.W. Bacterial community structure and metabolic profiles in a forest soil exhibiting spatially variable net nitrate production. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 37, p. 1581-1588, 2005.

LECHEVALIER, H.; LECHEVALIER, M.P. Chemotaxonomic use of lipids—an overview. In: RATLEDGE, C.; WILKINDON, S.C. (Ed.). **Microbial lipids**. London: Academic Press, 1988. p. 869–902.

LECKIE, S.E. Methods of microbial community profiling and their application to forest soils. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 220, p. 88-106, 2005.

LECKIE, S.E.; PRESCOTT, C.E.; GRAYSTON, S.J.; NEUFELD, J.D.; MOHN, W.W. Comparison of chloroform fumigation-extraction, phospholipids fatty acid, and DNA methods to determine microbial biomass in forest humus. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 529-532, 2004.

LEE, K.; LIU, C.; ANZAI, Y.; KIM, H.; AONO, T.; OYAIZU, H. The hierarchical system of the ‘*Alphaproteobacteria*’: description of *Hyphomonadaceae* fam. nov., *Xanthobacteraceae* fam. nov. and *Erythrobacteraceae* fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 55, p. 1907-1919, 2005.

LEHMAN, R.M.; O'CONNELL, S.P.; GARLAND, J.L.; COLWELL, F.S. Evaluation of remediation by community-level physiological profiles. In: INSAM, H.; RANGGER, A. (Ed.). **Microbial communities: functional versus structural approaches**. Heidelberg: Springer, 1997.

LEY, R.E.; LIPSON, D.A.; SCHMIDT, S.K. Microbial levels in barren and vegetated high altitude talus soils. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 65, p. 111-117, 2001.

LI, Q.; ALLEN, H.L.; WOLLUM II, A.G. Microbial biomass and bacterial functional diversity in forest soils: effects of organic matter removal, compaction, and vegetation control. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 571-579, 2004.

LIMA, V.P. Solo e eucalipto. In: _____. **Impacto ambiental do eucalipto**. 2ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1996. p. 14-168.

LINDSTRÖM, E.S.; VREDE, K.; LESKINEN, E. Response of a member of the *Verrucomicrobia*, among the dominating bacteria in a hypolimnion, to increased phosphorus availability. **Journal of Plankton Research**, New York, v. 26, p. 241-246, 2004.

LINDSTRÖM, J.E.; BARRY, R.P.; BRADDOCK, J.F. Microbial community analysis: a kinetic approach to constructing potential C source utilization patterns. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 30, p. 231-239, 1998.

LOBO, D.H. Araucária: necessidade de conservação e recomposição da araucária. **Florestar Estatístico**, São Paulo, v. 6, p. 10-11, 2003.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo: Plantarum, 1992. 351 p.

- LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 15, p. 155-173, 1994
- LUIZÃO, R.C.; CAMPISTA, D.; COSTA, E.S. Efeito da idade e do manejo das pastagens da Amazônia Central sobre a biomassa microbiana e suas atividades no solo. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 2., 1991, São Paulo. **Anais...** São Paulo: SBCS, 1991, p. 49.
- LYDELL, C.; DOWELL, L.; SIKAROODI, M.; GILLEVET, P.; EMERSON, D. A population survey of members of the phylum Bacteroidetes isolated from salt marsh sediments along the east coast of the United States. **Microbiology Ecology**, New York, v. 48, p. 263-273, 2004.
- MACALADY, J.L.; MACK, E.E.; NELSON, D.C.; SCOW, K. M. Sediment Microbial Community Structure and Mercury Methylation in Mercury-Polluted Clear Lake, California. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 1479-1488, 2000.
- MACRAE, A. The use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 31, p. 77-82, 2000.
- MADIGAN, M.T; MARTINKO, J.M; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. Englewood: Prentice-Hall, 2003. 874 p.
- MAGURRAN, E.E. **Ecological diversity and its measurement**. New Jersey: Princeton 12 University Press, 1988. 177 p.
- MALUCHE-BARETTA, C.R.D.; AMARANTE, C.V.T.; KLAUBERG-FILHO, O. Análise multivariada de atributos do solo em sistemas convencional e orgânico de produção de maçãs. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p. 1531-1539, 2006.
- MALUCHE-BARETTA, C.R.D.; KLAUBERG-FILHO, O.; AMARANTE, C.V.T. do; RIBEIRO, G.M.; ALMEIDA, D. Atributos microbianos e químicos do solo em sistemas de produção convencional e orgânico de maçãs no Estado de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, p. 655-666, 2007.
- MANTOVANI, A. **Fenologia reprodutiva e estrutura genética de uma população natural de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (Araucariaceae)**. 2003. 106p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Biologia Vegetal) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2003.
- MARCHIORI JÚNIOR, M.; MELO, W.J. Alterações na matéria orgânica e na biomassa microbiana em solo de mata natural submetido a diferentes manejos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, p. 1177-1182, 2000.
- MARCHESI, J.R.; TAKUICHI, S.; WEIGHTMAN, A.J.; MARTIN, T.A.; FRY, J.C.; HIOM, S.J.; WADE, W.G. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 795-799, 1998.

- MARSHALL, V.G. Impacts of forest harvesting on biological processes in northern forest soil. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 133, p. 43-60, 2000.
- McCAIG, A.E.; GLOVER, L.A.; PROSSER, J.I. Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 1721–1730, 1999.
- MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. 488 p.
- MERLIM, A.O. **Macrofauna edáfica em ecossistemas de araucária preservados e degradados no parque estadual de Campos do Jordão, SP**. 2005. 89 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- MESA, S.; VELASCO, L.; MANZANERA, M.E.; DELGADO, M.J.; BEDMAR, E.J. Characterization of the norCBQD genes, encoding nitric oxide reductase, in the nitrogen fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. **Microbiology**, Washington, v. 148, p. 3553–3560, 2002.
- MEURER, E.J. **Fundamentos de química do solo**. Porto Alegre: Genesis, 2000. 174 p.
- MILANEZ, F.R.; MONTEIRO NETO, H. Nota previa sobre a micorriza do pinho do Paraná. **Arquivos do Serviço Florestal**, Rio de Janeiro, v. 4, p. 87-93, 1950.
- MONDINI, C.; INSAM, H. Community level physiological profiling as a tool to evaluate compost maturity: a kinetic approach. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 39, p. 141-148, 2003.
- MOREIRA, F.M.S; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729 p.
- MOREIRA, M.; BARETTA, D. ; TSAI, S.M. ; GOMES-DA-COSTA, S.M ; CARDOSO, E. J. B. N. Biodiversity and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi in *Araucaria angustifolia* forest. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, p. 393-399, 2006.
- MOREIRA-SOUZA, M.; TRUFEM, S.F.B.; GOMES-DA-COSTA, S.M.; CARDOSO, E.J.B.N. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Mycorrhiza**, Berlim, v. 13, p. 211-215, 2003.
- MOYER, C.L.; TIEDJE, J.M.; DOBBS, F.C.; KARL, D.M. Diversity of deep-sea hydrothermal vent *Archaea* from Loihi Seamount, Hawaii. **Deep-sea Research**, Oxford, v.45, p.303-317, 1998.
- MROZ, G.; JURGENSEN, M.; HARVEY, A.; LARSEN, M. Effects of fire on nitrogen in forest floor horizons. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 44, p. 235-242, 1980.
- MUYZER, G.; RAMSING, N.B. Molecular methods to study the organization of microbial communities. **Water Science Technology**, Oxford, v. 32, p. 1-9, 1995.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 73, p. 127-141, 1999.

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 encoding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 695-700, 1993.

MYERS, R.M.; FISCHER, S.G.; LERMAN, L.S.; MANIATIS, T. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. **Nucleic Acids Research**, London, v. 3, p. 3131-3145, 1985.

MYERS, R.T.; ZAK, D.R.; WHITE, D.C.; PEACOCK, A. Landscape-level patterns of microbial community composition and substrate use in upland forest ecosystems. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 65, p. 359-367, 2001.

NANNIPIERI, P.; ASCHER, J.; CECCHERINI, M.T.; LANDI, L.; PIETRAMELLARA, G.; RENELLA, G. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 54, p. 655-670, 2003.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger principles of biochemistry**. 4th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2005. 1119 p.

NETTO, S.P.; SANQUETTA, C.R.; BRENA, P.A. **A floresta de Araucária e transições** – site 9. Disponível em: <http://www.icb.ufmg.br/~peld/port_site09.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2006.

NEUFELD, J.D.; MOHN, W.W. Unexpectedly high bacterial diversity in arctic tundra relative to boreal forest soils, revealed by serial analysis of ribosomal sequence tags. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 5710-5718, 2005.

NOGUEIRA, M.A.; ALBINO, U.B.; BRANDÃO-JUNIOR, O.; BRAUN, G.; DIAS, M.F.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.

NUTTO, L. Manejo do crescimento diamétrico de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze baseado na árvore individual. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 11, p. 9-25, 2001.

OCIO, J.A.; MARTINEZ, J.; BROOKES, P.C. Contribution to straw-derived N to total microbial biomass N following incorporation of cereal straw in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 23, p. 655-659, 1991.

O'DONNELL, A.G.; SEASMAN, M.; MACRAE, A.; WAITE, I.; DAVIES, J.T. Plants and fertilizers as drivers of change in microbial community structure and function in soils. **Plant and Soil**, The Hague, v. 232, p. 135-145, 2001.

ODUM, E.P. **Ecologia**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1983. 434 p.

OLAPADE, O.A.; GAO, X.; LEFF, L.G. Abundance of three bacterial populations in selected streams. **Microbial Ecology**, New York, v. 49, p. 461-467, 2005.

O'LEARY, W.M.; WILKINSON, S.G. Gram-positive bacteria. In: RATLEDGE, C.; WILKINDON, S.C. (Ed.). **Microbial lipids**. London: Academic Press, 1988. p. 117-202.

OLIVEIRA, M. de; VENTURA, A. **Ocorrência de micorriza em *Araucaria angustifolia* (Bertol) O. Ktze e *Podocarpus lambertii***. São Paulo: Serviço Florestal, 1952. 5 p. (Edições e Propaganda, 25).

ØVREÅS, L. Population and community level approaches for analyzing microbial diversity in natural environments. **Ecology Letters**, Oxford, v. 3, p. 236-251, 2000.

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**, Washington, v. 63, p. 3367-3373, 1997.

OWENSBY, C.; WYRILL, J. Effects of range burning on Kansas Flint Hills soil. **Journal of Range Management**, Denver, v. 26, p. 185-188, 1973.

PAPATHEODOROU, E.M.; ARGYROPOULOU, M.D.; STAMOU, G.P. The effects of large- and small-scale differences in soil temperature and moisture on bacterial functional diversity and the community of bacterivorous nematodes. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 25, p. 37-49, 2004.

PARKE, J.L.; GURIAN-SHERMAN, D. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 39, p. 225-258, 2001.

PENNANEN, T. Microbial communities in boreal coniferous forest humus exposed to heavy metals and changes in soil pH - a summary of the use of phospholipid fatty acids, Biolog and 3H-thymidine incorporation methods in field studies. **Geoderma**, Amsterdam, v. 100, p. 91-126, 2001.

PENNANEN, T.; LISKI, J.; BÁÁTH, E.; KITUNIN, V.; UOTILA, J.; WESTMAN, C.J.; FRITZE, H. Structure of the microbial communities in coniferous forest soils in relation to site fertility and stand development. **Microbial Ecology**, New York, v. 38, p. 168-179, 1999.

PEREIRA, R.M. **Diversidade bacteriana de um Latossolo sob cultivo intensivo e floresta através da análise metagenômica**. 2003. 75 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2003.

- PEREIRA, R.M.; SILVEIRA, E.L.da; SCAQUITTO, D.C.; PEDRINHO, E.A.N.; VAL-MORAES, S.P.; WICKERT, E.; CARARETO-ALVES, L.M.; LEMOS, E.G.M. Molecular characterization of bacterial populations of different soils. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 37, p. 439-447, 2006.
- PINTO-COELHO, R.M. **Fundamentos em ecologia**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000. 252 p.
- POWLSON, D.S.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in soil organic matter due to straw incorporation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 22, p. 1121-1127, 1987.
- PRESTON-MAFHAM, J.; BODDY, L.; RANDERSON, P.F. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilization profiles – a critique. **Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 42, p. 1-14, 2002.
- PRIHA, O.; GRAYSTON, S.J.; HIUKKA, R.; PENNANEN, T.; SMOLANDER, A. Microbial community structure and characteristics of the organic matter in soils under *Pinus sylvestris*, *Picea abies* and *Betula pendula* seedlings at two forest sites. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 33, p. 17–24, 2001.
- PRIMER 5 FOR WINDOWS. Versão 5.2.6, Primer-E Ltda. 2001
- PROGRAMA DNADIST. Disponível em:
<<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>>. Acesso em: 20 ago. 2007.
- PROGRAMA DOTUR (*Distance based OTU and Richness Determination*). Disponível em:
<<http://www.plantpath.wise.edu/fac/jah/dotur.html>>. Acesso em: 20 ago. 2007.
- PROGRAMA RDPquery. 2006. Disponível em:
<http://simo.marsci.uga.edu/public_db/rdp_query.htm>. Acesso em: 20 ago. 2007.
- PROGRAMA S-LIBSHUFF. Disponível em:
<<http://www.arches.uga.edu/~whitmann/libshuff.html>>. Acesso em: 20 ago. 2007.
- RAIJ, B.; QUAGGIO, J.A.; CANTARELLA, H.; ANDRADE, J.C. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2001. 284 p.
- RAPPÉ, M.S.; GIOVANONNI, S.J. The uncultured microbial majority. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 67, p. 369-394, 2003.
- RATLEDGE, C.; WILKINSON, S.G. **Microbial lipids**. London: Academic Press, 1988. 300 p.
- REITZ, R.; KLEIN, R.M.; REIS, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1988. 527 p.

RENDULIC, S.; JAGTAP, P.; ROSINUS, A.; EPPINGER, M.; BAAR, C.; LANZ, C.; KELLER, H.; LAMBERT, C.; EVANS, J.; GOESMANN, A.; MEYER, F.; SOCKETT, S.C.; SCHUSTER, S.C. A predator unmasked: life cycle of *Bdellovibrio bacteriovorus* from a genomic perspective. **Science**, Washington, v. 303, p. 689–692, 2004.

RHEINHEIMER, D.S.; SANTOS, J.C.P.; FERNANDES, V.B.B.; MAFRA, A.L.; ALMEIDA, J.A. Modificações nos atributos químicos de solo sob campo nativo submetido à queima. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, p. 49-55, 2003.

RIBOSSOMAL DATABASE PROJECT-RDP. Disponível em:
<<http://sdp.cme.msci.edu/idez.jsp>>. Acesso em: 20 ago. 2007.

RICE, C.W.; MOORMAN, T.B.; BEARE, M. Role of microbial biomass carbon and nitrogen in soil quality. In: DORAN, J.W.; JONES, A.J. (Ed.). **Methods for assessing soil quality**. Madison: Soil Science Society of America, 1996. p. 203-215. (Special Publication, 49)

RIZZINI, C. T. **Tratado de fitogeografia do Brasil**: aspectos ecológicos. São Paulo: HUCITEC/Ed. USP, 1976. 327 p.

ROBIM, M.de.J.; PASTORES, J.A.; AGUIAR, O.T.de.; BAITELLO, J.B. Flora arbórea arbustiva e herbácea do Parque Estadual de Campos do Jordão (SP). **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 2, p. 31-53, 1990.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 17, p. 319–339, 1999.

ROESCH, L.F.W.; FULTHORPE, R.R.; RIVA, A.; CASELLA, G.; HADWIN, A.K.M.; KENT, A.D.; DAROUB, S.H.; CAMARGO, F.A.O.; FARMERIE, W.G.; TRIPLERR, E. W. Pyrosequencing enumerates and constrasts soil microbial diversity. **The ISME Journal: Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology**, New York, v. 1, p. 283-290, 2007.

ROGER, B.F.; TATE III, R.L. Temporal analysis of the soil microbial community along a toposequence in Pineland soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 1389-1401, 2001.

RÖLING, W.F.M.; BRITO, I.R.C.; SWANNELL, R.P.J.; HAED, M.I. Response of community in beach sediments off spilled oil bioremediation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 2614–2620, 2004.

ROMARIZ, D.A. A vegetação. In: AZEVEDO, O. (Ed.). **Brasil, a terra e o homem**. São Paulo: Ed. Nacional, 1973. v. 1, p. 521-562.

RONDON, M.R.; AUGUST, P.R.; BETTERMANN, A.D.; BRADY, S.F.; GROSSMAN, T.H.; LILES, M.R.; LOIACONO, K.A.; LYNCH, B.A.; MacNEIL, I.A.; MINOR, C.; TIONG, C.L.; GILMAN, M.; OSBURNE, J.; CLARDY, M.S. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 2541-2547, 2000.

- ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F. Utilização de eletroforese em gel com gradiente de desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura (TGGE) para estudar diversidade microbiana. In: MELO, I.S. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2002. p. 97-128.
- ROSSELLÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v. 25, p. 39-67, 2001.
- SAETRE, P.; BÁÁTH, E. Spatial variation and patterns of soil microbial community structure in a mixed spruce-birch stand. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 32, p. 909-917, 2000.
- SAFFIGNA, P.G.; POWLSON, D.S.; BROOKES, P.C.; THOMAS, G.A. Influence of sorghum residues and tillage on soil organic matter in an Australian Vertisol. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 21, p. 759-765, 1989.
- SAITO, A.; MITSUI, H.; HATTORI, R.; MINAMISAWA, K.; HATTORI, T. Slow-growing and oligotrophic bacteria phylogenetically close to *Bradyrhizobium japonicum*. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 25, p. 277-286, 1998.
- SALAMANCA, E.F.; RAUBUCH, M.; JOEGENSEN, R.G. Relationships between soil microbial indices in secondary tropical forest soils. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 21, p. 211-219, 2002.
- SALATI, E.; VOSE, P.B. Amazon basin: a system in equilibrium. **Science**, Washington, v. 225, p. 129-138, 1984.
- SAMBROCK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 555 p.
- SANDAA, R.A.; ENGER, O.; TORSVIK, V. Abundance and diversity of Archaea in heavy-metal contaminated soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 3293-3297, 1999.
- SANQUETTA, C.R.; TETTO, A.F. **Pinheiro-do-Paraná**: lendas e realidades. Curitiba: Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná, Imprensa da UFPR. 1999. 112 p.
- SAS INSTITUTE. **SAS**: User's guide: statistics. 6th ed. Cary: Institute Inc. 2002.
- SASSER, M. **TN 101**: identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. Newark, 1990. 10 p.
- SCHEEREN, L.W.; GEHRARDT, E.J.; FINGER, C.A.G.; LONGHI, S.J.; SCHNEIDER, P.R. Agrupamento de unidades amostrais de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze, em função de variáveis do solo, da serapilheira e das acículas, na região de Canela, RS. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 1, p. 39-57, 2000.

SCHLEGEL, H.G. **General microbiology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1992. 843 p.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Introducing to DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.71, p.1501-1506, 2005.

_____. Toward a census of bacteria in soil. **PLOS Computational Biology**, San Francisco, v. 2, p. 786-787, 2006.

SCHUMACHER, M.V.; BRUN, E.J.; HERNANDES, J.I.; KÖNG, F.G. Produção de serapilheira em uma floresta de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze no município de Pinhal Grande - RS. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, p. 29-37, 2004.

SCHUTTER, M.E.; DICK, R.P. Comparison of Fatty Acid Methyl Ester (FAME) Methods for Characterizing Microbial Communities. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 64, p.1659–1668, 2000.

SEIBERT, P.; NEGREIROS, O.C.; BUENO, R.A.; EMMERICH, W.; MOURA NETTO, B.V.; MARCONDES, M.A.P.; CESAR, S.F.; GUILLAUMON, J.R.; MONTAGNA, R.A.A.; BARRETO, N.J.C.B.; GARRIDO, M.A.O.; MELLO FILHO, L.E.; EMMERICH, M.; MATTOS, J.R.; OLIVEIRA, M.C.; GODOI, A. **Plano de manejo do Parque Estadual Campos do Jordão**. São Paulo: Instituto Florestal, 1975. p. 1-148. (Boletim Técnico, 19).

SEITZ, R.A. A regeneração natural de *Araucaria angustifolia*. In: ANAIS DO CONGRESSO NACIONAL SOBRE ESSÊNCIAS NATIVAS, 1992, Campos do Jordão. **Anais...** Campos do Jordão: Silvicultura em São Paulo, 1992. p. 53-53

SEKIGUCHI, H. Yet-to-be culture microorganisms relevant to methane fermentation process. **Microbes and Environments**, Kyoto, v. 21, p. 1-15, 2006.

SETÄLÄ, H.; McLEAN, M.A. Decomposition rate of organic substrates in relation to the species diversity of soil saprophytic fungi. **Oecologia**, Berlin, v. 139, p. 98-107, 2004.

SHEFFIELD, V.C.; COX, D.R.; MYERS, R.M. Attachment of a 40 bp G+C rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 86, p. 232-236, 1989.

SHEN T.J.; CHAO, A.; LIN, C.F. Predicting the number of new species in further taxonomic sampling. **Ecology**, Ithaca, v. 84, p. 798–804, 2003.

SHING, B.K.; MUNRO, S.; REID, E.E.; ORD, B.; POTTS, M.J.; PATERSON, E.; MILLARD, P. Investigating microbial community structure in soils by physiological, biochemical and molecular fingerprinting methods. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 57, p. 72-82, 2006.

- SILVA, H.D.; BELLOTE, A.F.J.; FERREIRA, C.A.; BOGNOLA, I.A. Recomendação de solos para *Araucaria angustifolia* com base nas suas propriedades físicas e químicas. **Boletim de Pesquisa Floresta**, Colombo, n.43, p. 61-74, 2001.
- SILVEIRA, E.L.; PEREIRA, R.M.; SCAQUITTO, D.C.; PEDRINHO, E.A.; VAL-MORAES, S.P.; WICKERT, E.; CARARETO-ALVES; LEMOS, E.G.M. Bacterial diversity of soil under eucalyptus assessed by 16S rDNA sequencing analysis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p. 1507-1516, 2006.
- SIMÕES, J.W. Efeitos da omissão de nutrientes na alimentação mineral do Pinheiro do Paraná - *Araucaria angustifolia*. cultivado em vaso. **Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais**, Piracicaba, v.7, p. 3-40, 1973.
- SMALLA, K.; WACHTENDORF, U.; HEUER, H.; LIU, W.T.; FORNEY, L. Analysis of biological substrate utilization patterns by microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 1220-1225, 1998.
- SMIT, E.; LEEFLANG, P.; GOMMANS, S; BROEK, J. van den.; VAN, M.S. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 2284-91, 2001.
- SMITH, K.P.; GOODMAN, R.M. Host variation for interactions with beneficial plant-associate microbes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 473-491, 1999.
- SO, R.B; LADHA, J.K.; YOUNG, J.P. Photosynthetic symbionts of *Aeschynomene* spp. form a cluster with bradyrhizobia on the basis of fatty acid and rRNA analyses. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 44, p. 392-403, 1994.
- SOARES, R.V. Considerações sobre a regeneração natural da *Araucaria angustifolia*. **Floresta**, Curitiba, n. 2, p. 12-18, 1979.
- SOLÓRZANO-FILHO, J.A.; KRAUS, J. E. Breve história das matas de araucária. In: INTERNATIONAL CONGRESS AND EXHIBITION ON FORESTS, 5, 1999, Curitiba. **Forest 99**. Rio de Janeiro: Biosfera, 1999. p. 37-40.
- SORENSEN, L.H. Size and persistence of the microbial biomass formed during the humification of glucose, hemicellulose, cellulose and straw in soils containing different amounts of clay. **Plant and Soil**, The Hague, v. 75, p. 121-130, 1983.
- SOUCHIE, E.L.; SAGGIN-JÚNIOR, O.J, SILVA, E.M.R.; CAMPELLO, E.F.C.; AZCÓN, R.; BAREA, J.M. Communities of P-solubilizing bacteria, fungi and arbuscular mycorrhizal fungi in grass pasture and secondary forest of Paraty, RJ-Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 78, p. 183-193, 2006.
- SPIERS, A.J.; BUCKLING, A.; RAINEY, P.B. The causes of *Pseudomonas* diversity. **Microbiology**, New York, v. 146, p. 2175-2182, 2002.

- SPRENT, J.I. **Nodulation in legumes**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2001. p. 146.
- STALEY, J. T. Biodiversity: are microbial species threatened? **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 8, p. 340–345, 1997.
- STEFANOWICZ, A. The biolug plates technique as a tool in ecological studies of microbial communities. **Polish Journal of Environmental Studies**, Olsztyn, v. 15, p. 669-676, 2006.
- STEINER, M.; STEINER, S.; O’LEARY, W.M.; WILKINSON, S.G.; BRENNAN, P.J.; SMITH, P.F.; RATTRAY, J.B.M.; LOSEL, D.M. Distribution of lipids. In: RATLEDGE, C.; WILKINSON, S.G. (Eds.). **Microbial Lipids**. London: Academic Press, 1988. v.1, p. 83–902.
- SUADICANI, K.F. **Seminário sobre *Araucaria* spp.** Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Departamento de Engenharia Florestal, Disciplina Culturas Florestais, 1993. 20 p.
- SWOFFORD, D.L. **PAUP***: Phylogenteic analysis using parsimony*and other methods (version 4.0b 10). Sunderland: Sinauer Associates, 2003.
- TAN, Z.; HUREK, T.; VINUESA, P.; MULLER, P.; LADHA, J.K.; REINHOLD-HUREK, B. Specific detection of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* strains colonizing rice (*Oryza sativa*) roots by 16S–23S ribosomal DNA intergenic spacer- targeted PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 3655–3664, 2001.
- TER BRAAK, C.J.F. Canonical correspondence analysis: a new eigenvector technique for multivariate direct gradiente analysis. **Ecology**, Ithaca, v. 67, p. 1167-1179, 1986.
- TER BRAAK, C.J.F.; SMILAUER, P. **Canoco reference manual and user’s guide to Canoco for Windows**: software for canonical community ordination (version 4). New York: irocomputer Power, 1998.
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 4876-4882, 1997.
- TIMONEN, S.; FINLAY, R.D.; OLSSON, S.; SODERSTROM, B. Dynamics of phosphorous translocation in intact ectomycorrhizal systems: non-destructive monitoring using a B-scanner. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 19, p. 171-180, 1996.
- TISDALL, J.M.; OADES, J.M. Organic matter and water stable aggregates in soil. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 38, p. 141-163, 1982.
- TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 5, p. 240-245, 2002.
- TORSVIK, V.; GOKSØYR, J.; DAAE, F.L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, p. 782–787, 1990.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L.; THINGSTAD, T.F Prokaryotic diversity—magnitude, dynamics, and controlling factors, **Science**, Washington, v. 296, p. 1064–1066, 2002.

TREVES, D.S.; XIA, B.; ZHOU, J.; TIEDJE, J.M. A two-species test of the hypothesis that spatial isolation influences microbial diversity in soil. **Microbial Ecology**, New York , v. 45, p. 20-28, 2003.

TSCHERKO, D.; HAMMESFAHR, U.; MARX, M.C.; KANDELER, E. Shifts in rhizosphere microbial communities and enzyme activity of *Poa alpina* across an alpine chronosequence. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 1685-1698, 2004.

Van GOOR, C. P. **Reflorestamento com coníferas no Brasil**: aspectos ecológicos das plantações na região Sul, particularmente com *Pinus elliottii* e *Araucária angustifolia*. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, Setor de Inventários Florestais, 1965. 58 p. (Boletim, 9).

VANCE, E.D.; BROOKS, 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.

VÁZQUEZ, F.J.; ACEA, M.J.; CARBALLAS, T. Soil microbial populations after wildfire. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 13, p. 93–104, 1993.

VENTER, J. C. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. **Science**, Washington, v. 304, p. 66–74, 2004.

VESSEY, J.K.; FEY, H. Involvement of cytokinin in the stimulation of nodulation by low concentrations of ammonium in *Pisum sativum*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 188, p. 447-455, 2003.

VESTAL, J. R.; WHITE, D.C. Lipid analysis in microbial ecology. **BioScience**, Washington, v. 8, p. 535–541, 1989.

WALDROP, M.P.; BALSER, T.C.; FIRESTONE, M.K. Linking microbial community composition to function in a tropical soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 32, p. 1837–1846, 2000.

WALLWORK, J.A. Ecology of soil animals. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 9, p. 215-220, 1970.

WARDLE, D.A.; HUNGRIA, M.A. A biomassa microbiana do solo e sua importância nos ecossistemas terrestres. In: ARAÚJO, R.S.; HUNGRIA, M. (Ed.). **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: EMBRAPA, 1994. p. 193-216.

WEST, A.W.; ROSS, D.J.; COWLING, J.C. Changes in microbial C, N, P and ATP contents, numbers and respiration on storage of soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 18, p. 141-148, 1986.

- WHITE, C.; TARDIF, J.C.; ADKINS, A.; STANIFORTH, R. Functional diversity of microbial communities in the mixed boreal plain forest of central Canada. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 37, p. 1359-1372, 2005.
- WHITE, D.C.; DAVIS, W.M.; NICKELS, J.S.; KING, J.D.; BOBBIE, R.J. Determination of sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate. **Oecologia**, Berlin, v. 40, p. 51-62, 1979.
- WHITTAKER, R.H. New concepts of kingdoms of organisms. **Science**, Washington, v. 163, p. 150-160, 1969.
- WIDMER, F.; SHAFFER, B.T.; PORTEOUS, L.A.; SEIDLER, R.J. Analysis of *nifH* gene pool complexity in soil and litter at a Douglas fir forest site in the Oregon Cascade Mountain Range. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 374-380, 1999.
- WILKINSON, S.C.; ANDERSON, J.M.; SCARDELIS, S.P.; TISIAFOULI, M.; TAYLOR, A.; WOLTERS, V. PLFA profiles of microbial communities in decomposing conifer litters subject to moisture stress. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 34, p. 189-200, 2002.
- WOESE, C.R. Bacterial evolution. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 51, p. 221-271, 1987.
- WOESE, C.R.; STACKEBRANDT, E.; MACKE, T.J.; FOX, G.E. A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 6, p. 143-151, 1985.
- YAO, H.; HE, Z.; WILSON, M.J.; CAMPBELL, C.D. Microbial biomass and community structure in a sequence of soils with increasing fertility and changing land use. **Microbial Ecology**, New York, v. 40, p. 223-237, 2000.
- ZAHRAN, H.H. Rhizobia from wild legume: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 91, p. 143-153, 2001.
- ZAK, D.R.; PREGITZER, K.S.; CURTIS, P.S.; HOLMES, W.E. Atmospheric CO₂ and the composition and function of soil microbial communities. **Ecological Applications: A Publication of the Ecological Society of America**, Washington, v. 10, p. 47-59, 2000.
- ZAK, J.C.; WILLIG, M.R.; MOORHEAD, D.L.; WILDMAN, H.G. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 26, p. 1101-1108, 1994.
- ZELLES, L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 29, p. 111-129, 1999.
- ZELLES, L.; BAI, Q.Y.; BECK, T.; BEESE, F. Signature fatty acids microbial biomass and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure in agricultural soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 24, p. 317-323, 1992.

ZHANG, H.; SEKIGUCHI, Y.; HANADA, S.; HUGENHOLTZ, P.; KIM, H.; KAMAGATA, Y.; NAKAMURA, K. *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum Gemmatimonadetes phyl. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Berks, v. 53, p. 1155-1163, 2003.

ZILLI, J.E.; RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G.R.; COUTINHO, H.L.C.; NEVES, M.C.P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, Brasília, v. 20, p. 391-411, 2003.

ANEXO

ANEXO 1 – Estimativas de riqueza de UTOS e frequência das seqüências de cada área estudada [floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima (RQ)], no PECJ

(continua)

UTOS	Seqüências de clones do gene rRNA 16S		
	FN	RF	RQ
1	1	51	-----
2	2,154	93,105	-----
3	3	-----	-----
4	4,179	-----	-----
5	5,88	73,22,165	15,58,139
6	6,35	-----	-----
7	8	-----	-----
8	9,89	124	72
9	16	127	51
10	17	-----	-----
11	20,25	-----	-----
12	21	-----	-----
13	22	118,187	69,80
14	23	-----	-----
15	24	3	-----
16	26	-----	-----
17	27	-----	-----
18	28	53	-----
19	30	79	44
20	33	-----	-----
21	34	-----	-----
22	36,52	-----	-----
23	37	-----	-----
24	38	-----	-----
25	41	-----	-----
26	45	-----	67
27	46	-----	49
28	48,129	-----	-----
29	49	-----	-----
30	50	69	-----
31	51	-----	-----
32	54,180	136	-----

ANEXO 1 – Estimativas de riqueza de UTOS e frequência das seqüências de cada área estudada [floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima (RQ)], no PECJ

(continuação)

UTOS	Seqüências de clones do gene rRNA 16S		
	FN	RF	RQ
34	57	-----	10,108,113,126
35	58,62	-----	-----
36	59	-----	-----
37	60	-----	-----
38	64,73,78,135,151	143,150, 178, 162	103,106,120,160,168
39	65	-----	-----
40	68	-----	-----
41	69	-----	-----
42	70,145,188	-----	47,132
43	72	-----	-----
44	74	-----	-----
45	75	-----	-----
46	76	-----	-----
47	77,85	-----	-----
48	80	-----	-----
49	81	-----	-----
50	84	-----	-----
51	86	-----	-----
52	87	-----	-----
53	92	-----	-----
54	93	-----	-----
55	94	-----	-----
56	95	-----	-----
57	96,112,117	-----	178
58	97	-----	-----
59	98	-----	-----
60	99	-----	-----
61	103	-----	-----
62	104,107,111,133,159	64,74,91	16,30,164,176
63	106	34,66	159,188
64	108	-----	158
65	109	-----	-----

ANEXO 1 – Estimativas de riqueza de UTOS e frequência das seqüências de cada área estudada [floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima (RQ)], no PECJ

(continuação)

UTOS	Seqüências de clones do gene rRNA 16S		
	FN	RF	RQ
66	110	-----	-----
67	115	-----	-----
68	118		29,64,100,116,136
69	121	-----	-----
70	122	-----	-----
71	123	-----	-----
72	130	-----	-----
73	132	-----	60
74	134	-----	-----
75	136	-----	53
76	141	-----	-----
77	144	-----	-----
78	146,165	11,18,31,152,188	32
79	148	-----	-----
80	152	-----	-----
81	155	-----	-----
82	158	-----	-----
83	160	-----	-----
84	163	-----	-----
85	164	-----	-----
86	166	-----	-----
87	170	-----	-----
88	171	61,113,172	-----
89	175	55	144
90	176	-----	-----
91	177	-----	-----
92	182	-----	-----
93	189	-----	-----
94	-----	4,108	96,152
95	-----	5	-----
96	-----	5	-----
97	-----	7	-----

ANEXO 1 – Estimativas de riqueza de UTOS e frequência das seqüências de cada área estudada [floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima (RQ)], no PECJ

(continuação)

UTOS	Seqüências de clones do gene rRNA 16S		
	FN	RF	RQ
98	-----	8	-----
99	-----	9,10	-----
100	-----	12,72	-----
101	-----	13,36	-----
102	-----	17	-----
103	-----	19	-----
104	-----	21	-----
105	-----	23	-----
106	-----	24	-----
107	-----	25	-----
108	-----	32	-----
109	-----	33	-----
110	-----	35,100	-----
111	-----	37	-----
112	-----	39	3,70,102
113	-----	40	109,189
114	-----	42	-----
115	-----	43	-----
116	-----	44	-----
117	-----	45	-----
118	-----	46,148	-----
119	-----	47	-----
120	-----	48,153	-----
121	-----	50	-----
122	-----	52,88	19
123	-----	54	155,182
124	-----	56	63,82
125	-----	57	-----
126	-----	58,82	-----
127	-----	60	-----
128	-----	62	-----
129	-----	63	-----

ANEXO 1 – Estimativas de riqueza de UTOS e frequência das seqüências de cada área estudada [floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima (RQ)], no PECJ

(continuação)

UTOS	FN	RF	RQ
	Seqüências de clones do gene rRNA 16S		
130	-----	65,77	-----
131	-----	68	-----
132	-----	70,84	26,131
133	-----	71	-----
134	-----	75	-----
135	-----	76	-----
136	-----	78	-----
137	-----	80,139	-----
138	-----	81	-----
139	-----	83	12,59,84,130
140	-----	85	-----
141	-----	86	-----
142	-----	87,100	-----
143	-----	89	-----
144	-----	90	-----
145	-----	92	-----
146	-----	94	-----
147	-----	95	-----
148	-----	96	-----
149	-----	101	-----
150	-----	102	-----
151	-----	103	-----
152	-----	104,129	-----
153	-----	112	-----
154	-----	114	-----
155	-----	115	-----
156	-----	116	-----
157	-----	117	24169
158	-----	119	-----
159	-----	120	-----
160	-----	125,137	-----
161	-----	128	-----

ANEXO 1 – Estimativas de riqueza de UTOS e frequência das seqüências de cada área estudada [floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima (RQ)], no PECJ

(continuação)

UTOS	FN	RF	RQ
Seqüências de clones do gene rRNA 16S			
162	-----	130	-----
163	-----	131	-----
164	-----	132,164	-----
165	-----	140	-----
166	-----	141	-----
167	-----	142	-----
168	-----	144	-----
169	-----	151	-----
170	-----	155	-----
171	-----	156	-----
172	-----	160	61,137
173	-----	163	55,170
174	-----	166	-----
175	-----	167	-----
176	-----	168	-----
177	-----	173	-----
178	-----	174	-----
179	-----	175	-----
180	-----	176	14
181	-----	177	-----
182	-----	179	-----
183	-----	180	-----
184	-----	-----	1
185	-----	-----	2,91
186	-----	-----	4,87
187	-----	-----	5
188	-----	-----	6
189	-----	-----	5
190	-----	-----	8,37
191	-----	-----	9
192	-----	-----	11
193	-----	-----	13

ANEXO 1 – Estimativas de riqueza de UTOS e frequência das seqüências de cada área estudada [floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima (RQ)], no PECJ

(continuação)

UTOS	FN	RF	RQ
Seqüências de clones do gene rRNA 16S			
194	-----	-----	17
195	-----	-----	18,46
196	-----	-----	20,146,138,172
197	-----	-----	21,93
198	-----	-----	23
199	-----	-----	25
200	-----	-----	27
201	-----	-----	28,89
202	-----	-----	31
203	-----	-----	33
204	-----	-----	34
205	-----	-----	35,95
206	-----	-----	38
207	-----	-----	40
208	-----	-----	41
209	-----	-----	42
210	-----	-----	43
211	-----	-----	45,88
212	-----	-----	48
213	-----	-----	50,184
214	-----	-----	52
215	-----	-----	54
216	-----	-----	57
217	-----	-----	62
218	-----	-----	65
219	-----	-----	66
220	-----	-----	67
221	-----	-----	68
222	-----	-----	71
223	-----	-----	73
224	-----	-----	74
225	-----	-----	75

ANEXO 1 – Estimativas de riqueza de UTOS e frequência das seqüências de cada área estudada [floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima (RQ)], no PECJ

(continuação)

UTOS	FN	RF	RQ
Seqüências de clones do gene rRNA 16S			
226	-----	-----	76
227	-----	-----	77
228	-----	-----	78
229	-----	-----	79
230	-----	-----	81
231	-----	-----	83
232	-----	-----	85
233	-----	-----	86
234	-----	-----	90
235	-----	-----	92
236	-----	-----	94
237	-----	-----	97
238	-----	-----	98
239	-----	-----	99
240	-----	-----	101,127
241	-----	-----	104
242	-----	-----	105
243	-----	-----	107
244	-----	-----	110
245	-----	-----	112
246	-----	-----	115
247	-----	-----	117
248	-----	-----	118
249	-----	-----	119
250	-----	-----	121
251	-----	-----	122
252	-----	-----	124
253	-----	-----	125
254	-----	-----	128
255	-----	-----	129
256	-----	-----	133
257	-----	-----	134

ANEXO 1 – Estimativas de riqueza de UTOS e frequência das seqüências de cada área estudada [floresta nativa com predomínio de araucária (FN), reflorestamento de araucária (RF) e reflorestamento de araucária com queima (RQ)] dentro de cada UTO, no PECJ

(conclusão)

UTOS	FN	RF	RQ
Seqüências de clones do gene rRNA 16S			
258	-----	-----	135
259	-----	-----	140
260	-----	-----	141
261	-----	-----	142
262	-----	-----	143
263	-----	-----	145,157
264	-----	-----	147
265	-----	-----	148,174
266	-----	-----	149
267	-----	-----	151
268	-----	-----	153
269	-----	-----	156
270	-----	-----	161
271	-----	-----	162
272	-----	-----	163
273	-----	-----	166
274	-----	-----	171
275	-----	-----	173
276	-----	-----	175
277	-----	-----	177
278	-----	-----	179
279	-----	-----	180
280	-----	-----	183
281	-----	-----	185
282	-----	-----	186
283	-----	-----	190
284	-----	-----	192

ANEXO 2 – Numeração dos clones seqüenciados em cada tratamento

Placa1*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
C	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
D	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
E	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
F	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
G	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
H	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
Placa2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108
B	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
C	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132
D	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144
E	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156
F	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168
G	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
H	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192

* Número de placas seqüenciadas de cada biblioteca.

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](#)