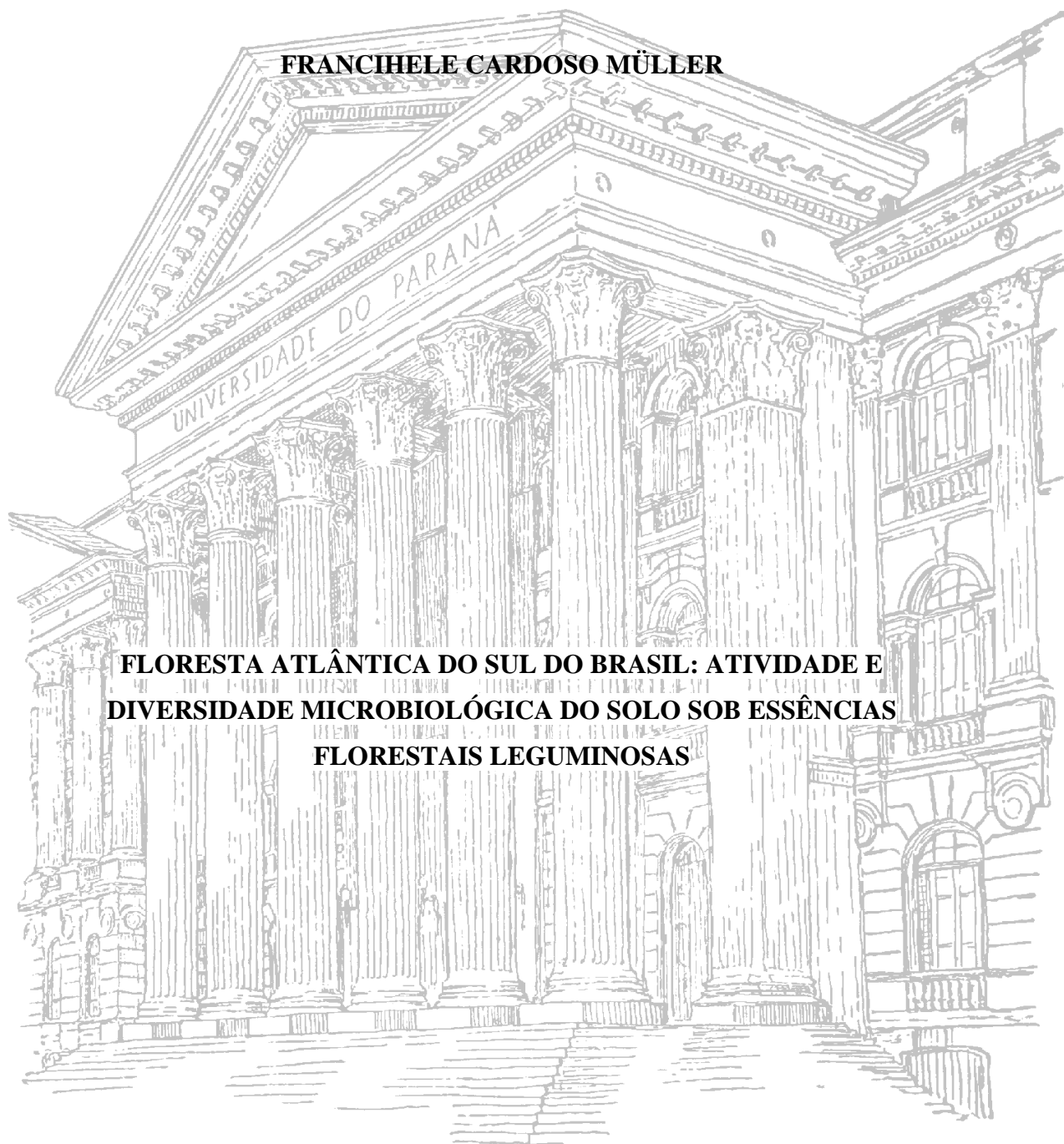


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FRANCIHELE CARDOSO MÜLLER



**FLORESTA ATLÂNTICA DO SUL DO BRASIL: ATIVIDADE E
DIVERSIDADE MICROBIOLÓGICA DO SOLO SOB ESSÊNCIAS
FLORESTAIS LEGUMINOSAS**

CURITIBA

2016

FRANCIHELE CARDOSO MÜLLER

**FLORESTA ATLÂNTICA DO SUL DO BRASIL: ATIVIDADE E
DIVERSIDADE MICROBIOLÓGICA DO SOLO SOB ESSÊNCIAS
FLORESTAIS LEGUMINOSAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de Concentração Conservação da Natureza, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia Florestal.

Orientador: Prof. Dr. Renato Marques

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fátima Maria de Souza Moreira

Co-Orientador: Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza

CURITIBA

2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Florestais e da Madeira - UFPR

Müller, Francihele Cardoso

Floresta atlântica do sul do Brasil: atividade e diversidade microbiológica do solo sob essências florestais leguminosas / Francihele Cardoso Müller. – Curitiba, 2016.
114 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Renato Marques

Coorientadores: Profª. Drª. Fátima Maria de Souza Moreira

Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal. Defesa: Curitiba, 15/07/2016.

Área de concentração: Conservação da Natureza.

1. Solos florestais - Brasil. 2. Microrganismos do solo. 3. Mata Atlântica. 4. Teses.
I. Marques, Renato. II. Moreira, Fátima Maria de Souza. III. Souza, Emanuel Maltempi de. IV. Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias. V. Título.

CDD – 634.9

CDU – 634.0.114(81)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Programa de Pós Graduação em ENGENHARIA FLORESTAL
Código CAPES: 40001016015P0


ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM ENGENHARIA FLORESTAL

No dia quinze de Julho de dois mil e dezesseis às 13:30 horas, na sala de Reuniões, Avenida Lothário Meissner, 632, do Setor de CIÊNCIAS AGRÁRIAS da Universidade Federal do Paraná, foram instalados os trabalhos de arguição da doutoranda **FRANCIELE CARDOSO MULLER** para a Defesa Pública de sua Tese intitulada: "**FLORESTA ATLÂNTICA DO SUL DO BRASIL: ATIVIDADE E DIVERSIDADE MICROBIOLÓGICA DO SOLO SOB ESSÊNCIAS FLORESTAIS LEGUMINOSAS**". A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA FLORESTAL da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: RENATO MARQUES (UFPR), FATIMA MARIA DE SOUZA MOREIRA (UFLA), GLACIELA KASCHUK (UFPR), KELLY GERONAZZO MARTINS (UNICENTRO), SERGIO GAIAD. Dando início à sessão, a presidência passou a palavra a discente, para que a mesma expusesse seu trabalho aos presentes. Em seguida, a presidência passou a palavra a cada um dos Examinadores, para suas respectivas arguições. A aluna respondeu a cada um dos arguidores. A presidência retomou a palavra para suas considerações finais e, depois, solicitou que os presentes e a doutoranda deixassem a sala. A Banca Examinadora, então, reuniu-se sigilosamente e, após a discussão de suas avaliações, decidiu-se pela APROVAÇÃO da aluna. A doutoranda foi convidada a ingressar novamente na sala, bem como os demais assistentes, após o que a presidência fez a leitura do Parecer da Banca Examinadora. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, RENATO MARQUES, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora.

Curitiba, 15 de Julho de 2016.

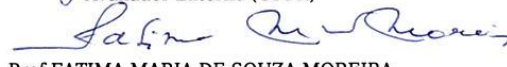



Prof RENATO MARQUES
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


Prof KELLY GERONAZZO MARTINS
Avaliador Externo (UNICENTRO)


Prof SERGIO GAIAD


Prof GLACIELA KASCHUK
Avaliador Externo (UFPR)


Prof FATIMA MARIA DE SOUZA MOREIRA
Avaliador Externo (UFLA)

Aos meus pais Renato e Nehi, ao meu irmão Jeferson pelo apoio, confiança e amor incondicional.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho e enriquecimento científico e à Capes pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Renato Marques, pela disponibilidade, apoio, ensinamentos e confiança no meu trabalho.

À ONG Sociedade de Pesquisa em Vida Selvagem e Educação Ambiental por permitir que essa pesquisa fosse realizada na Reserva Natural da Guaricica.

À minha co-orientadora, Prof^a Dr^a Fatima Moreira, pela disponibilidade e atenção em me receber na Universidade Federal de Lavras e aprender com sua singularidade.

Aos Prof. Dr. Emanuel M. Souza, por acreditar em nossa idéia e abrir as portas do setor de Bioquímica da UFPR.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, em especial o Prof. Dr. Volnei Pauletti, por disponibilizar o laboratório de Nutrição de Plantas e pelas palavras de incentivo.

Aos meus colegas de orientação, meus irmãos, Cristine, Fabiana, Jonas, Hilbert, Carolina e Everaldo. Vocês foram essenciais durante este período. Tornaram meus dias mais leves e produtivos. Sem vocês nenhuma coleta teria sido realizada, pois além da amizade sei que posso contar com a força braçal e boa vontade. Agradeço especialmente à Cris, pessoa ímpar, com a qual compartilhei dúvidas e angústias, que sempre esteve presente com uma doce palavra de apoio e esperança.

Aos funcionários dos Departamentos de Solos e Engenharia Agrícola e Bioquímica.

Aos colegas e amigos que fiz durante a Disciplina de Microbiologia e Bioquímica do Solo, na UFLA. Pela receptividade e por dividirem suas experiências. Agradeço especialmente a Amanda Azarias pelas discussões sobre o mundo da microbiologia do solo, pela amizade, por abrir sua casa e me receber, além de me proporcionar conhecer a cultura e a diversidade mineira.

À Vania Pankievicz, pela grande parceria e auxílio fundamental nas análises moleculares.

À Marília Bastos pelas horas de discussão sobre meu trabalho, por abrir minha mente nos momentos de dificuldade e pela amizade de todas as horas.

Aos meus pais que, apesar da saudade e desejo de estar sempre por perto, sempre me apoiaram. Por acreditarem na minha capacidade e nos meus sonhos, vocês são minha inspiração de respeito, dedicação e humildade. Ao meu irmão, que sempre me ouviu com atenção e me incentivou a crescer e também à Rúbia. É difícil viver com tanta ausência, impaciência, cansaço, saudade, mas felizmente hoje ganhamos a nossa recompensa, porque cabe a vocês uma grande parcela desta conquista.

Ao meu namorado, André Dias, que por muito tempo teve de aceitar minha ausência, mesmo quando estávamos próximos. Por me ouvir, mesmo sem entender muita coisa, mas sempre tentando aprender um pouco sobre o meu trabalho. Você foi fundamental para a conclusão desta etapa tão importante na minha vida.

Aos meus amigos que, mesmo distantes, estiveram presentes nessa caminhada e que sempre acreditaram na minha capacidade, apoiaram, e nunca deixaram que a tristeza e o desânimo chegassem perto de mim, mesmo que eu não pudesse dar-lhes a atenção merecida e não pudesse estar presente em momentos importantes de suas vidas. Gracieli Persich, Tatiana Pinheiro, Alexandre Sartori vocês são essenciais em minha vida e fazem parte das minhas conquistas.

Aos meus ex-alunos da URI - campus de Santo Ângelo, Setrem e IF Farroupilha - campus Alegrete. Vocês me deram a oportunidade de aprender e crescer com vocês, me fizeram ter certeza de que a docência é um caminho de amor, trabalho duro e muitas recompensas.

Aos amigos que o Alegrete me trouxe, que me apoiaram nos momentos de dificuldade e estiveram presentes em momentos de alegria.

À todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão desse trabalho.
Muito Obrigada!

*“O Papel dos infinitamente pequenos
é infinitamente grande”*

Louis Pasteur

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO GERAL	16
RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	17
1 OBJETIVOS.....	18
1.2 Objetivo Geral.....	18
1.2 Objetivos específicos.....	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1 Mata Atlântica.....	19
2.2 Matéria Orgânica do solo.....	20
2.3 Biomassa Microbiana	21
2.4 Carbono e Nitrogênio da Biomassa Microbiana.....	22
2.5 Essências Florestais leguminosas e bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico.....	23
2.6 Métodos de avaliação da diversidade de microrganismos.....	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Regiões de Estudo.....	27
3.2 Caracterização química do solo.....	29
3.3 Espécies arbóreas.....	31
3.3.1 Espécies florestais da Família Fabaceae (Leguminosae).....	31
3.3.1.1 <i>Andira anthelmia</i> (Vell.) J.F. Macb.....	31
3.3.1.2 <i>Inga edulis</i> Mart.....	32
3.3.1.3 <i>Inga striata</i> Benth.....	32
3.3.1.4 <i>Pterocarpus rorhii</i> Vahl.....	32
4 LITERATURA CITADA.....	33
CAPÍTULO 2 – BIOMASSA E ATIVIDADE MICROBIANA EM SOLOS SOB ESPÉCIES NATIVAS LEGUMINOSAS EM ÁREAS DE REGENERAÇÃO NATURAL NA MATA ATLÂNTICA DO SUL DO BRASIL.....	43
RESUMO.....	43

1	INTRODUÇÃO	44
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
	2.1 Clima na área no período de estudo.....	46
	2.2 Coletas de solo e acondicionamento das amostras.....	46
	2.3 Determinação do peso do solo seco.....	47
	2.4 Determinação do Carbono da Biomassa Microbiana do Solo (CBM) e Nitrogênio microbiano (N_{mic}).....	47
	2.5 Determinação da Respiração Basal do Solo (RBS).....	49
	2.6 Quociente Metabólico (qCO_2).....	50
	2.7 Análises estatísticas.....	50
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
	3.1 Carbono da Biomassa Microbiana.....	51
	3.2 Nitrogênio microbiano.....	53
	3.3 Respiração Basal do Solo.....	56
	3.4 Quociente Metabólico.....	60
4	CONCLUSÕES.....	61
5	LITERATURA CITADA.....	62

CAPÍTULO 3 – MINERALIZAÇÃO DE NITROGÊNIO EM SOLOS SOB ESPÉCIES NATIVAS LEGUMINOSAS EM ÁREAS DE REGENERAÇÃO NATURAL NA MATA ATLÂNTICA DO SUL DO BRASIL.....	68
RESUMO.....	69

1	INTRODUÇÃO.....	70
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	72
	2.1 Coletas de solo.....	72
	2.2 Ensaio de mineralização de nitrogênio orgânico do solo.....	72
	2.3 Análise química dos solos.....	75
	2.4 Análises estatísticas.....	75
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
4	CONCLUSÕES.....	82
5	LITERATURA CITADA.....	83

CAPÍTULO 4 – DIVERSIDADE BACTERIANA DIAZOTRÓFICA DO SOLO EM ÁREAS DE REGENERAÇÃO NATURAL DA MATA ATLÂNTICA DO SUL DO BRASIL.....	88
RESUMO.....	88
1 INTRODUÇÃO.....	89
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	91
2.1 Coletas de solo e acondicionamento das amostras.....	91
2.2. Análise química dos solos.....	91
2.3 Isolamento de bactérias diazotróficas	91
2.4 PCR.....	93
2.5 Tratamento do produto amplificado para sequenciamento.....	94
2.6 Reação de sequenciamento	94
2.7 Sequenciamento.....	94
2.8 Análise das sequências.....	95
2.9 Estoque dos isolados.....	95
2.10 Análises estatísticas.....	95
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
4 CONCLUSÕES.....	107
5 LITERATURA CITADA.....	108

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Localização da Reserva Natural da Guaricica, Antonina-PR e localização dos sítios de estudo, ao longo das trilhas Corvo, Ferro e Pinheiro..... 28

CAPÍTULO 2

Figura 1. Dados de precipitação acumulada e temperaturas em Antonina, PR (I refere-se as médias de precipitação da primeira quinzena do mês e II refere-se as médias de precipitação da segunda quinzena do mês).....46

Figura 2. Colocação dos extratos irradiados e não irradiados para determinação do CBM e N_{mic} (A) e equipamento em funcionamento (B).....48

Figura 3. Incubação das amostras (A), amostra após período de incubação (B) e titulação do NaOH (C).....49

Figura 4. Valores médio de CBM sob espécies leguminosas nas profundidades de 0 a 5 e 5 a 10 cm no outono. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.....52

Figura 5. Valores médios de CBM nas diferentes estações avaliadas, sob espécies leguminosas. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.52

Figura 6. Valores médios de Carbono e Nitrogênio da Biomassa Microbiana no outono e primavera, sob espécies leguminosas. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.....56

Figura 7. Valores médio de Respiração Basal do Solo nas diferentes profundidades. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.....59

Figura 8. Valores médio de Respiração Basal do Solo no outono e primavera nas profundidades de 0 a 5 e 5 a 10 cm. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.....59

CAPÍTULO 3

Figura 1. Coleta das amostras de solo (A), retirada das camadas de 0-5 e 5-10 cm do monólito (B), peneiramento (C) adição da amostra à solução extratora (D), extração da solução de KCL 2 mol L⁻¹ (E) e incubação das amostras na temperatura de 30°C (F)....

Figura 2. Extratos diluídos e adicionados soluções para leitura de amônic ... espectrofotômetro.....75

Figura 3. Valores médios de N mineralizado em estações distintas indiferentemente da profundidade. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.....78

Figura 4. Valores médios de N mineral acumulado sob diferentes espécies leguminosas no outono na profundidade de 0 a 5 cm. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.....	79
Figura 5. Valores médios de N mineral acumulado sob diferentes espécies leguminosas no outono na profundidade de 5 a 10 cm. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.....	79
Figura 6. Valores médios de N mineral acumulado sob diferentes espécies leguminosas na primavera na profundidade de 0 a 5 cm. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.....	80
Figura 7. Valores médios de N mineral acumulado sob diferentes espécies leguminosas na primavera na profundidade de 5 a 10 cm. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.....	80

CAPÍTULO 4

Figura 1. Frascos mostrando controle positivo (A), controle negativo (B), película em crescimento (C), formação de película (D) e película na superfície (E).....	92
Figura 2. Purificação dos isolados cultivados a partir de amostras de solo sob essências florestais leguminosas em áreas de regeneração natural Floresta Atlântica do sul do Brasil.....	93
Figura 3. Quantidade de indivíduos de diferentes gêneros de bactérias sob essências florestais leguminosas da Mata Atlântica do Sul do Brasil. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.....	99
Figura 4. Abundância relativa dos gêneros de bactérias encontradas sob essências florestais leguminosas da Mata Atlântica do Sul do Brasil. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.	100
Figura 5. Frequência relativa dos gêneros de bactérias encontradas sob essências florestais leguminosas da Mata Atlântica do Sul do Brasil. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.	101
Figura 6. Análise discriminante dos parâmetros químicos, espécies de bactérias e essências florestais em área de regeneração natural da Mata Atlântica do sul do Brasil.	103
Figura 7. Avaliação química do solo (pH, Alumínio, Potássio, Fósforo, Cálcio, Magnésio e Carbono) sob essências florestais leguminosas da Mata Atlântica do Sul do Brasil (C – Corvo 6; P – Pinheiro; F7 – Ferro 7; F10 – Ferro 10).....	105
Figura 7. Análise discriminante dos atributos químicos (pH, C, P, K, Ca e Mg) em áreas de regeneração natural da Mata Atlântica do Sul do Brasil.....	6

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Características químicas das amostras de solo coletadas nas profundidades de 0-5 e 5-10 cm, Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.....	30
--	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1. CBM sob espécies leguminosas em diferentes profundidades no outono e primavera. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.....	51
Tabela 2. CBM sob espécies leguminosas nas profundidades de 0 a 5 e 5 a 10 cm na primavera. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.	51
Tabela 3. Valores médios de N mic sob espécies leguminosas no outono e primavera. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.	54
Tabela 4. N mic sob espécies leguminosas nas profundidades de 0 a 5 e 5 a 10 cm no outono e primavera. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.....	54
Tabela 5. Interação dos fatores estação x espécie - N mic do Solo sob espécies leguminosas. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.....	55
Tabela 6. Respiração Basal do Solo sob espécies leguminosas no outono e primavera. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.....	56
Tabela 7. Interação dos fatores profundidade x espécie - Respiração Basal do Solo sob espécies leguminosas nas profundidades de 0 a 5 e 5 a 10 cm no outono e primavera Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.....	58
Tabela 8. Valores médios do Quociente Metabólico sob espécies leguminosas no outono e primavera, na profundidade de 0 a 5 e 5 a 10 cm. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.....	61

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Valores médios de N mineralizado, no outono, sob diferentes espécies florestais. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.....	76
Tabela 2. Valores médios de N mineralizado, na primavera, sob diferentes espécies florestais. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.....	76

Tabela 3. N mineralizado nas profundidades de 0 a 5 e 5 a 10 cm, no outono e primavera, sob essências florestais leguminosas da Mata Atlântica. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.....77

CAPÍTULO 4

Tabela 1. Classificação dos grupos de bactérias em áreas de regeneração natural da Mata Atlântica do Sul do Brasil. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.....98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MOS – Matéria Orgânica do Solo

BMS – Biomassa Microbiana do Solo

RBS – Respiração Basal do Solo

CBM – Carbono da Biomassa Microbiana

$q\text{CO}_2$ – Quociente Metabólico

N_{mic} – Nitrogênio Microbiano

RNG – Reserva Natural da Guaricica

APA – Área de Proteção Ambiental

SPVS – Sociedade de Pesquisa em Vida Selvagem e Educação Ambiental.

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO GERAL

Autor: Francihele Cardoso Müller

Orientador: Prof. Dr. Renato Marques

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fátima Maria de Souza Moreira

Co-Orientador: Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza

RESUMO GERAL

A diversidade, a abundância e a dinâmica da microbiota do solo em florestas dependem, em grande parte, do processo de transformação da matéria orgânica do solo, cujas características dependem da vegetação florestal. Acredita-se que a presença de diferentes espécies florestais sobre o solo pode influenciar a BMS e a atividade microbiana; e entre outros, o processo de mineralização do N no solo. Os objetivos deste trabalho foram investigar as relações entre espécies arbóreas leguminosas (*Andira anthelmia*, *Inga edulis*, *Inga striata*, *Pterocarpus rorhii*) nativas da Floresta Atlântica do Sul do Brasil e parâmetros edáficos de natureza microbiológica. Avaliou-se C da biomassa microbiana (CBM) e N microbiano (N_{mic}), respiração basal do solo (RBS), quociente metabólico (qCO_2) e a mineralização do nitrogênio; e caracterizou-se genotipicamente as comunidades microbianas do solo em áreas de regeneração natural em diferentes estágios sucessionais. A extração do CBM e N_{mic} foi realizada pelo método de irradiação-extração, a RBS por incubação das amostras com retenção de CO_2 por NaOH e o qCO_2 pela razão entre RBS e CBM; taxa de N mineralizado foi avaliada pelo método de incubação anaeróbica; e a diversidade de bactérias diazotróficas foi realizada pelo método de diluição seriada e cultivo em placa com os meios LGI, NFb e JNFb, purificação das colônias, amplificação e sequenciamento do 16S. Os resultados CBM e N_{mic} foram mais elevados no solo sob *Inga edulis* e *Andira anthelmia*; a RBS foi mais elevada no outono; qCO_2 foi menor na primavera. Os valores de CBM e N_{mic} foram mais elevados no solo sob *Inga edulis* e *Andira anthelmia*; a RBS foi mais elevada no outono; qCO_2 foi menor na primavera. Os valores de N mineralizado foram mais elevados nos solos sob *I. edulis*, assim como na camada superficial do solo e variaram conforme as estações do ano; indicando, assim, influência da espécie florestal, da profundidade de amostragem e das condições meteorológicas sobre a atividade microbiana. A caracterização genotípica mostrou que as bactérias encontradas pertencem aos filos *Proteobacteria* (90,4%), *Firmicutes* (4,8%) e *Actinobacteria* (4,8%). A maior diversidade de gêneros ocorreu nos solos sob *A. anthelmia* (14 gêneros); *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Pseudomonas* e *Rhizobium* foram mais frequentes, somando 37,5% da frequência total de gêneros; observou-se distinção das espécies florestais, com características como valores de pH, P, K, Ca e Mg agrupadas ao *I. edulis*; e, por fim, a distinção da floresta primária quanto as características químicas do solo. Assim, o estudo conclui que os fatores clima, espécies florestais e formação florestal podem influenciar o desenvolvimento e atividade microbiana do solo.

Palavras-chave: Biomassa Microbiana do Solo, mineralização de N, bactérias diazotróficas, atividade microbiana e Fixação Biológica de Nitrogênio.

ABSTRACT

The diversity, abundance and dynamics of soil microbiota in forests depends to a large extent on the process of transformation of soil organic matter, the characteristics of which depend on forest vegetation. It is believed that the presence of different forest species on the soil can influence BMS and microbial activity; and among others, the process of N mineralization in the soil. The objectives of this work were to investigate the relationships between tree species (*Andira anthelmia*, *Inga edulis*, *Inga striata*, *Pterocarpus rorhii*) native to the Atlantic Forest of southern Brazil and edaphic parameters of a microbiological nature. It was evaluated the carbon of the microbial biomass (CMB) and microbial nitrogen (N_{mic}), basal respiration of the soil (BRS), metabolic quotient (qCO_2) and the mineralization of the nitrogen; and the microbial communities of the soil were characterized genotypically in areas of natural regeneration in different successional stages. The extraction of the CMB and N_{mic} was carried out by the irradiation-extraction method, the BRS by incubation of the samples with retention of CO_2 by NaOH and the qCO_2 by the ratio between BRS and CMB; mineralized N rate was evaluated by anaerobic incubation method; and the diversity of diazotrophic bacteria was performed by the serial dilution method and plaque culture with the LGI, NFb and JNFb media, colonization purification, 16S amplification and sequencing. The CMB and N_{mic} results were higher in the soil under *Inga edulis* and *Andira anthelmia*; BRS was highest in the fall; qCO_2 was lower in spring. The values of mineralized N were higher in the soils under *I. edulis*, as well as in the superficial layer of the soil and they varied according to the seasons of the year; indicating, therefore, the influence of the forest species, the depth of sampling and the meteorological conditions on the microbial activity. The genotypic characterization showed that the bacteria found belong to the phyla *Proteobacteria* (90,4%), *Firmicutes* (4,8%) and *Actinobacteria* (4,8%). The greatest diversity of genera occurred in soils under *A. anthelmia*; *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Pseudomonas* and *Rhizobium* were more frequent, accounting for 37.5% of the total frequency; was observed the distinction between forest species, with characteristics such as pH, P, K, Ca and Mg values grouped with *I. edulis*; and, finally, the distinction of the primary forest as the chemical characteristics of the soil. Thus, the study concludes that the factors climate, forest species and forest formation may influence the development and microbial activity of the soil.

Key-words: Soil Microbial Biomass, mineralization of N, diazotrophic bacterial, microbial activity and Biological Nitrogen Fixation.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito de essências florestais leguminosas e das características químicas do solo sobre parâmetros microbiológicos e sobre a diversidade microbiana do solo em áreas de regeneração natural da Floresta Atlântica do Sul do Brasil.

1.2 Objetivos Específicos

- Estimar a biomassa microbiana do solo;
- Avaliar a respiração basal do solo;
- Correlacionar a presença das essências florestais avaliadas com a atividade microbiana do solo;
- Avaliar as características químicas do solo sob as essências florestais leguminosas;
- Avaliar a mineralização do nitrogênio no solo;
- Caracterizar diversidade microbiana dos solos nas áreas estudadas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Mata Atlântica

A Mata Atlântica, um bioma intercontinental, é considerada mundialmente como uma das áreas mais ricas em biodiversidade e mais ameaçadas do planeta, figurando entre os *hotspots* mundiais (Conservation International do Brasil et al., 2000). O desmatamento nas últimas três décadas foi responsável pela redução de 18.509 km² do seu território total. Atualmente existem apenas 8,5% de remanescentes florestais com mais de 100 hectares e os fragmentos acima de 3 hectares representam 12,5% dos 1,3 milhão de km² do território original (Fundação SOS Mata Atlântica & INPE, 2014). Conforme último mapeamento do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2004), a Mata Atlântica abrange uma área de 1.110.182 km², da qual apenas 26,97% correspondem à vegetação nativa e dos quais 21,80% compõem-se de fisionomias florestais distintas.

A sua devastação atingiu, no período de 2012 a 2013, a maior taxa anual desde 2008. Foram desmatados cerca de 23.948 hectares (239 km²) nos 17 estados que compõem o bioma; um aumento de 9% em relação ao período anterior. O estado do Paraná apresentou 2.126 hectares de áreas desmatadas, fazendo parte do grupo dos quatro estados (Minas Gerais, Piauí, Bahia e Paraná) responsáveis por 92% do total de desflorestamentos (SOS Mata Atlântica & Inpe, 2014).

A Mata Atlântica possui de 1 a 8% do total de espécies conhecidas no mundo, configurando um grande número de espécies com alto endemismo em vários grupos taxonômicos (Mittermeier et al., 2005).

A conservação e recuperação deste bioma é um desafio, pois o conhecimento sobre sua biodiversidade é fragmentado e permanece sob forte pressão antrópica. Além disso, a Mata Atlântica é responsável por cerca de 70% do PIB nacional, abrigando mais de 60% da população brasileira; e possuindo as maiores extensões dos solos mais férteis do país (Rodrigues et al., 2009).

Para a manutenção e recuperação dessas áreas foram consolidadas, dentre outras, as Reservas Particulares do Patrimônio Natural (RPPN) que, conforme o Decreto N° 5.746 de abril de 2006, têm como objetivo conservar a diversidade biológica, devendo-se estimular a pesquisa nestas áreas. No estado do Paraná estão registradas 244 RPPN's, dentre elas encontra-se a Reserva Natural da Guaricica, abrangendo 8.700 hectares (IAP,

2016; SPVS, 2014), onde, além da conservação das florestas, foram restaurados outros mil hectares, substituindo áreas de pastagem por espécies nativas da região.

Desta forma, a conservação do pouco que sobrou daquilo que inadequadamente foi desflorestado, ou por uma questão legal ou pelas características do ambiente, se faz necessária e urgente, dependendo de ações e esforços coletivos e exigindo a mobilização geral da sociedade em sua defesa (Rodrigues et al., 2009).

2.2 Matéria Orgânica do Solo

A matéria orgânica do solo (MOS) é constituída de uma mistura de resíduos de plantas e animais do solo, em diferentes estágios de decomposição, de substâncias sintetizadas por processos químicos e biológicos e de microrganismos e pequenos animais mortos, caracterizando frações lábeis e estáveis (Theng et al., 1989). Em sua formação ocorrem processos simultâneos de novas adições de materiais, de decomposição e de sintetização de novos compostos, caracterizando sua transitoriedade e dinamismo (Schnitzer, 1991).

Por atuar como fonte de carbono, energia e nutrientes para os microrganismos quimiheterotróficos e, através do processo de mineralização de N e S, fornecer energia aos quimioautotróficos, a matéria orgânica afeta diretamente as características biológicas do solo. Em condições inadequadas de manejo, nas regiões tropicais e subtropicais, a degradação da fração orgânica do solo ocorre de forma rápida e acompanhada de um processo global de degradação das condições químicas, físicas e biológicas dos solos (Bayer & Mielniczuk, 2008).

Os diferentes compostos da MOS são degradados por grupos especializados de microrganismos heterotróficos, que produzem enzimas extracelulares específicas, promovendo a quebra das macromoléculas em monômeros. Estes são metabolizados pelas células microbianas, que usam parte desta energia e carbono para a produção de biomassa e proliferação, sendo a outra parte liberada para a atmosfera em forma de CO₂ ou CH₄, completando assim o ciclo do carbono. A biomassa produzida representa uma imobilização temporária de energia, carbono e elementos minerais, que serão liberados após sua morte e decomposição, tornando os elementos nutrientes disponíveis para a absorção pelas raízes, para transformações adicionais ou para sofrer lixiviação no solo (Siqueira & Franco, 1988).

Na constituição da MOS, a biomassa microbiana, apesar de encontrar-se quantitativamente reduzida, é de grande significância, uma vez que os produtos do seu metabolismo representam uma das principais fontes do N mineral e P para as plantas (Jenkinson & Laad, 1981).

O efeito da MOS sobre as condições biológicas do solo pode ser avaliado a partir da biomassa e atividade microbiana, parâmetros que representam uma integração de efeitos desta sobre as condições biológicas do solo (Bayer & Mielniczuk, 2008).

2.3 Biomassa Microbiana

O solo é o ecossistema terrestre que apresenta a maior diversidade de microrganismos, micro, macro e mesofauna, em virtude da natureza dinâmica e complexa inerente a ele (Moreira & Siqueira, 2006).

Os organismos do solo interagem intensamente com as partículas do solo e são responsáveis por inúmeros processos biológicos e bioquímicos essenciais para garantir a sustentação do ecossistema onde vivem (Marchiori Júnior & Melo, 1999), desempenhando importante papel na manutenção da produtividade de ecossistemas florestais (Gama-Rodrigues & Gama-Rodrigues, 2008).

A biomassa microbiana, definida como a parte viva da matéria orgânica, representa um importante componente ecológico, pois atua diretamente na decomposição e mineralização dos resíduos vegetais no solo, fazendo uso destes como fonte de nutrientes e energia para formação e o desenvolvimento de suas células, bem como para a síntese de substâncias orgânicas no solo (Gama-Rodrigues & Gama-Rodrigues, 2008). Compreende, ainda, uma fonte potencial de N, P, S e outros nutrientes para as plantas (De-Polli & Guerra, 2008).

A biodiversidade microbiana é o maior indicador de qualidade do solo, assegurando a redundância funcional daquele habitat, garantindo sua resiliência. Por exemplo, algumas condições ambientais podem inativar ou eliminar alguns grupos de organismos enquanto outros organismos os substituem permitindo a execução de processos fundamentais no solo (Moreira et al., 2013).

A comunidade microbiana sofre interferência não apenas pelas mudanças resultantes de sua atividade fisiológica e metabólica, mas também pelas interferências químicas e físicas do meio que o circunda (Hunter-Cevera, 1998). Dependendo dos

aspectos geográficos, geológicos, hidrológicos, climáticos, faunístico e florístico e das influências antropogênicas, o solo apresenta propriedades que determinam a sua comunidade microbiana (Liesack et al., 1997).

Fatores como tipo de solo e espécie vegetal influenciam na quantidade e qualidade dos exsudados, favorecendo ou não a presença de grupos de organismos na rizosfera. As excreções radiculares representam uma importante fonte de C e energia para os microrganismos heterotróficos do solo. Assim, a diversidade da cobertura vegetal do solo poderá favorecer a diversidade microbiana, considerando que quanto maior a diversidade vegetal, maior será a diversidade dos compostos orgânicos secretados e excretados que, conseqüentemente, favorecerão o crescimento de organismos com exigências nutricionais mais diversas (Moreira & Siqueira, 2006; Bayer & Mielniczuk, 2008).

Conforme Cardoso et al. (2009), a manutenção do equilíbrio entre a cobertura vegetal e os processos biogeoquímicos do solo, em floresta nativa, com solos de baixa fertilidade natural, é mediada pelos microrganismos no solo. Seu equilíbrio e manutenção ainda podem ser relacionados com a produção de substâncias reguladoras de crescimento de plantas, produzidas por uma parcela significativa dos microrganismos rizosféricos (Moreira & Siqueira, 2006).

2.4 Carbono e Nitrogênio da Biomassa Microbiana

A decomposição e a mineralização dos resíduos vegetais dependem da atividade microbiana e por este motivo a avaliação da biomassa microbiana do solo (BMS) é fonte de importantes informações para o entendimento da ciclagem de nutrientes (Paul & Clark, 1996).

As primeiras técnicas de quantificação da BMS eram realizadas através do biovolume de todos os microrganismos presentes em uma determinada porção do solo, a partir de observações microscópicas dos microrganismos oriundos de uma amostra. Porém era necessário conhecer as dimensões e o número de cada tipo de microrganismo. Embora o método da observação direta tenha sido pioneiro e o único disponível até cerca de três décadas atrás, apresentava dificuldades como pouca precisão e baixo rendimento (De-Polli & Guerra, 2008).

Sendo a biomassa microbiana estimada com base na concentração de algum elemento ou substância celular, e não da atividade, pode-se quantificá-la, a partir da

concentração de carbono e nitrogênio microbiano. Dentre os métodos de quantificação do carbono microbiano encontram-se fumigação-incubação (Jenkinson & Powlson, 1976), respiração induzida pela adição de substrato (Anderson & Domsch, 1978), índice de trifosfato adenosina (Oades & Jenkinson, 1979), fumigação-extração (Vance et al., 1987; Sparling & West, 1988; Tate et al., 1988) e irradiação-extração (Ferreira et al., 1999).

Conforme Ferreira et al. (1999), a utilização de micro-ondas para irradiação das amostras, em frequência e concentração de energia específicas, pode ser utilizada para estimar os valores de C e N microbianos, de forma semelhante aos obtidos pela fumigação com clorofórmio, reduzindo os coeficientes de variação nas amostras de solo submetidas ao procedimento de extração, indicando este método como o mais adequado para estimar o C e o N microbiano no solo. A desvantagem de métodos como a fumigação- e irradiação-extração, segundo Brandão-Junior et al. (2008), estaria na necessidade da utilização de dicromato de potássio, pela sua toxicidade; e na ausência de um analisador automático.

Os valores de C e N da biomassa microbiana do solo, quando associados aos resultados da atividade microbiana e atributos químicos, como C orgânico e N total, representam valores que expressam de forma adequada a dinâmica do C e N nos ecossistemas (Monteiro & Gama-Rodrigues, 2004). A relação C microbiano/C orgânico indica qualidade da matéria orgânica e como a eficiência da transformação do carbono do solo em carbono microbiano, da mesma forma como a relação N microbiano/N total reflete a conversão do N do solo em N microbiano (Sparling, 1992).

2.5 Essências florestais leguminosas e bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico

O nitrogênio ocupa posição de destaque entre os elementos essenciais ao crescimento e desenvolvimento das plantas. Sua baixa disponibilidade, dependente da mineralização da matéria orgânica do solo pela microbiota, o torna um nutriente limitante ao crescimento vegetal (Bremner, 1965; Stevenson, 1982; Camargo et al., 1999).

Algumas bactérias apresentam a enzima nitrogenase, capaz de reduzir o nitrogênio atmosférico (N_2) a amônia (NH_3), forma disponível às plantas e outros organismos. Este processo caracteriza a Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) realizada por microrganismos diazotróficos ou fixadores de nitrogênio (Moreira & Siqueira, 2006).

As bactérias fixadoras de N podem ser de vida livre no solo e na água, associativas ou simbiontes. Os microrganismos de vida livre necessitam um ambiente com disponibilidade de carbono disponível para realização da FBN (Kuss, 2006); os microrganismos associativos, também denominados endofíticos, colonizam o interior e exterior de raízes, caules e folhas; e as simbiontes possuem capacidade de formar estruturas especializadas denominadas de nódulos, interagindo a nível genético, bioquímico e fisiológico; e são conhecidas como bactérias nodulíferas de leguminosas (Moreira et al., 2013).

O grupo das leguminosas pertencente à família Fabaceae, a qual é dividida em três subfamílias, Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae (Lewis et al., 2005). Apresentam atributos importantes para recuperação de solo, como a capacidade de associar-se com bactérias diazotróficas, agentes da fixação de N atmosférico (Faria & Franco, 2002), processo que representa a principal fonte de N para a biosfera terrestre, além de ser relevante na ciclagem de N nas florestas tropicais (Galloway, 2008).

Em regiões de clima tropical, em razão da intensa radiação solar e grande quantidade de chuva, as taxas de decomposição da matéria orgânica do solo são elevadas (Spaccini et al., 2002). Essa disponibilidade de recursos afeta significativamente a estrutura e atividade das populações diazotróficas, interferindo diretamente nas taxas de fixação biológica de nitrogênio, processo dependente da abundância, diversidade e distribuição espacial de bactérias diazotróficas (Reed et al., 2010).

2.6 Métodos de avaliação da diversidade de microrganismos

A diversidade de microrganismos é tão vasta quanto desconhecida. Um grama de solo pode conter 10 bilhões de microrganismos, representando milhares de espécies (Rosseló-Mora & Amann, 2001). O estudo da biodiversidade no solo representa importante ferramenta na identificação das interações entre microrganismos e plantas, esclarecendo o equilíbrio das estruturas no meio em que vivem (Pereira et al., 1996).

Visando facilitar a avaliação da densidade, diversidade e processos intermediados pelo microrganismos do solo, alguns métodos vêm sendo desenvolvidos. A exemplo, tem-se os meios de cultivo, onde, uma vez crescidos nestes, espécies de organismos-alvo podem ser isolados em cultura pura, onde poderão ser distinguidas por suas características fenotípicas e genéticas específicas (Moreira & Siqueira, 2006).

Para detectar a presença de bactérias diazotróficas não simbiotes, utilizam-se meios de cultivos que não contem nitrogênio em sua formulação e possuem consistência semi-sólida como LGI, JNFb e NFb (Döbereiner et al., 1995).

Em 1985, com um grande avanço experimental, baseado no trabalho pioneiro de Carl Woese, demonstrou-se que genes do RNA ribossomal (rRNA) poderiam ser utilizados como ferramentas de medida de divergência evolutiva (Woese, 1987). A análise direta das sequências dos genes rRNA 5S e 16S foi utilizada para a descrição da diversidade de microrganismos em uma amostra ambiental, sem isolamento ou cultivo (Lane et al., 1985).

Desde então, vem sendo muito empregado em estudos de diversidade o sequenciamento de genes que codificam para subunidades do RNA ribossomal. O gene rRNA 16S possui características fundamentais, tais como: i) presença de regiões com sequência de nucleotídeos hipervariáveis entre regiões conservadas; ii) presença em todos os procariotos; iii) aparente ausência de transferência genética lateral; e iv) tamanho considerado satisfatório para estudos filogenéticos; possibilitando, assim, sua utilização em estudos de ecologia (Amann & Ludwig, 2000). O gene 16S, podendo ser amplificado pela PCR e seu produto sequenciado, é um dos mais utilizados na detecção de relações entre bactérias (Weisburg et al., 1991).

A caracterização genotípica de microrganismos ocorre através de técnicas que necessitam de quantidades de DNA adequadas, obtidas a partir da reação em cadeia da polimerase (PCR). Esta reação consiste na amplificação *in vitro* de fragmentos específicos do DNA extraído, como o gene 16S, detectados com *primers* de sequência construída para se acoplarem a regiões alvo do DNA e dar início à amplificação que é conduzida pela enzima *Taq*polimerase (Moreira & Siqueira 2006). Após a amplificação, os genes são submetidos ao sequenciamento e análise das sequências obtidas.

A diversidade de informações de sequências de DNA e ferramentas de análise têm possibilitado o desenvolvimento de novas metodologias para comparar a diversidade microbiana em diferentes ambientes e associá-los a atributos do solo (Lambais et al., 2005).

A comunidade de diazotróficos cultiváveis é extremamente variada e somente poucas bactérias foram identificadas e caracterizadas (Yanni et al., 1997). Estima-se que, de toda a diversidade de microrganismos do solo, apenas 0,1 a 1% destes sejam cultiváveis (Moreira & Siqueira, 2006), implicando nos estudos baseados em isolamento

microbiológico, que podem incluir somente uma parte minoritária da diversidade microbiana total.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Regiões de Estudo

As parcelas de estudo estão localizadas na Reserva Natural da Guaricica (RNG) (Figura 1), situada na porção oeste-noroeste da Baía de Antonina, no município de Antonina, região litorânea do Estado do Paraná, fazendo parte da Zona de Conservação da Vida Silvestre da Área de Proteção Ambiental (APA) de Guaraqueçaba. A reserva pertence à Organização Não Governamental (ONG) Sociedade de Pesquisa em Vida Selvagem e Educação Ambiental (SPVS); representa 10,33% da superfície do município de Antonina. Sua área atual é de 8.635,90 ha e seus pontos extremos têm como coordenadas geográficas as Latitudes 25°24' - 25°41' – Sul e as Longitudes de 48°64' - 48°74' - Oeste.

A RNG está cercada pela Serra do Mar ao norte e ao leste; ao sul pelo estuário dos rios Cachoeira e Faisqueira; e a oeste por um trecho de planície cruzado pelos rios Cacatu, do Nunes, Xaxim e Curitibaíba, que também encontra o sopé da Serra do Mar (SPVS, 2005). Abrange a fitofisionomia Floresta Ombrófila Densa ocorrendo nas formações Aluvial, das Terras Baixas e Submontana. Cada uma dessas formações difere entre si em vários aspectos, como composição e riqueza de espécies, estratificação, classe de solo, microclima, dentre outros. Como está situada numa zona de transição entre o compartimento continental da planície litorânea e a Serra do Mar e as condições edafoclimáticas são favoráveis ao desenvolvimento vegetal, essa fitofisionomia possui a maior diversidade e riqueza de espécies dentre as formações florestais da Floresta Atlântica.

Os sítios escolhidos para a realização da presente pesquisa são parcelas permanentes de 1 ha cada, em formação submontana, situadas ao longo de trilhas conhecidas como Corvo, Ferro e Pinheiro (Figura 1), classificadas de acordo com seu estágio sucessional.

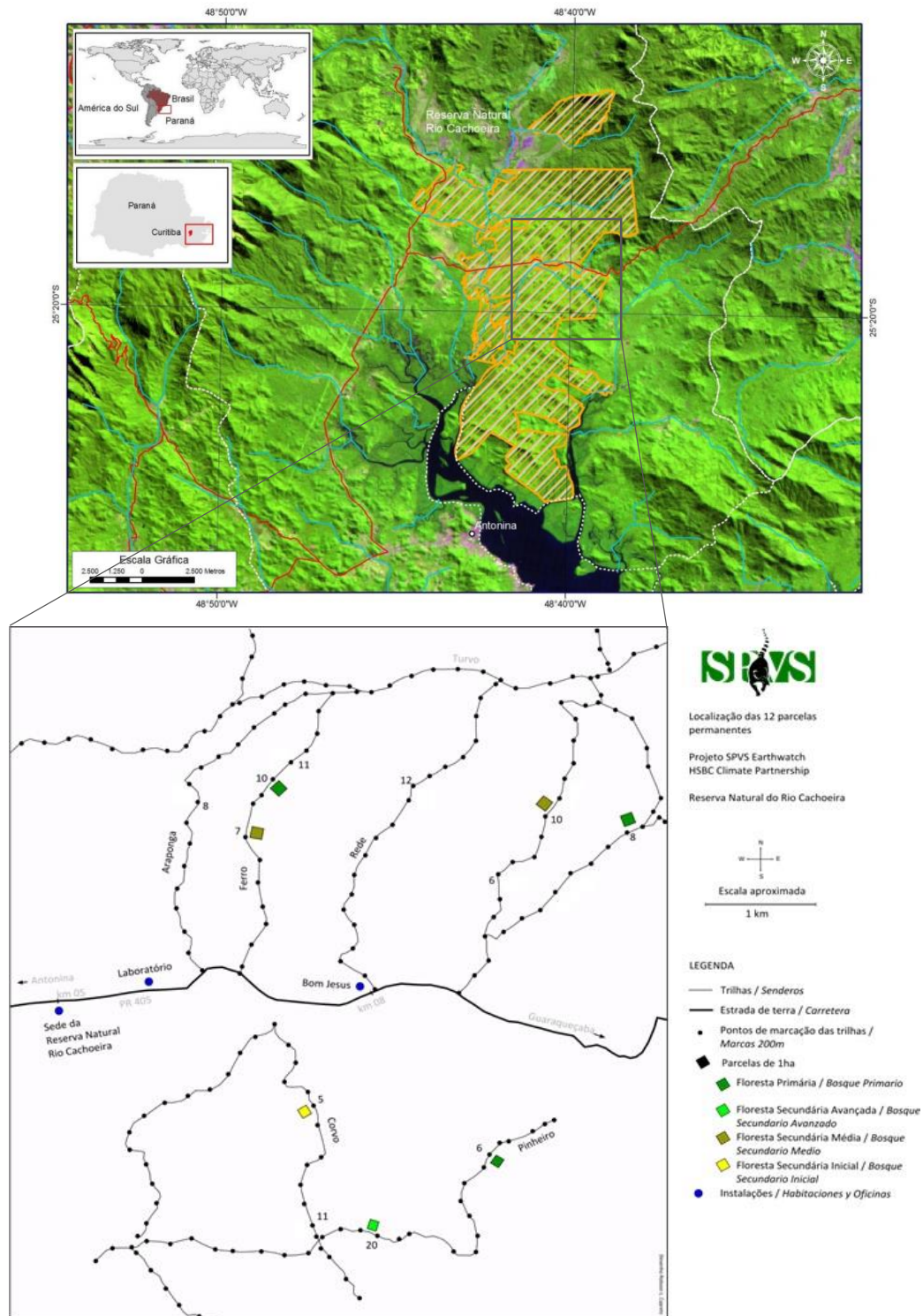


Figura 1. Localização da Reserva Natural da Guaricica, Antonina-PR e localização dos sítios de estudo, ao longo das trilhas Corvo, Ferro e Pinheiro. Adaptado de Borgo (2010) e SPVS (2005).

3.2 Caracterização química do solo

A interpretação dos resultados da análise de solo (Tabela 1) realizada com base na Comissão de Química e Fertilidade do Solo – RS/SC (2004) demonstram que os sítios de estudo apresentam acidez elevada, de maneira geral, independente da área e profundidade onde o solo foi coletado, refletindo também na baixa saturação de bases. Os teores de P encontram-se de baixos a altos, com os maiores valores nas camadas superiores. Os teores de potássio demonstraram-se médios, enquanto os teores Ca e Mg encontram-se abaixo do considerado satisfatório.

Tabela 1. Características químicas das amostras de solo coletadas nas profundidades de 0-5 e 5-10 cm, Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.

Sítio	Prof.	pH	Al	H+Al	P	C	Ca	Mg	K	Na	T	V	Cu	Mn	Fe	Zn
		CaCl ₂	cmol _c dm ⁻³	cmol _c dm ⁻³	mg kg ⁻¹	g dm ⁻³	-----cmol _c dm ⁻³ -----				%	-----mg kg ⁻¹ -----				
F7	0-5 cm	3,42	1,94	13,19	10,87	39,42	0,49	0,58	0,15	0,06	14,47	8,87	0,70	1,20	15,75	0,20
	5-10 cm	3,44	1,99	11,53	9,11	25,80	0,25	0,24	0,10	0,05	12,16	5,16	0,50	0,41	15,72	0,12
F10	0-5 cm	3,57	1,67	10,97	8,66	23,10	1,09	0,60	0,20	0,07	12,94	14,92	0,80	3,84	8,04	0,27
	5-10 cm	3,56	1,96	11,04	8,25	20,01	0,68	0,40	0,15	0,06	12,33	10,01	0,80	2,80	8,49	0,22
C6	0-5 cm	3,19	2,96	15,66	5,32	46,01	0,16	0,31	0,11	0,06	16,31	4,01	0,20	0,15	10,83	0,16
	5-10 cm	3,29	2,94	13,87	5,20	35,11	0,16	0,22	0,09	0,06	14,40	3,74	0,20	0,11	11,40	0,14
P6	0-5 cm	3,68	1,97	8,78	4,40	36,34	0,55	0,56	0,12	0,06	10,02	12,29	0,15	3,10	8,31	0,25
	5-10 cm	3,71	2,09	8,54	2,96	23,36	0,24	0,28	0,08	0,04	9,13	6,51	0,16	1,19	8,80	0,15
P20	0-5 cm	3,60	1,58	9,79	7,61	35,89	0,96	0,87	0,16	0,06	11,87	18,18	0,80	3,56	11,94	0,23
	5-10 cm	3,54	1,98	10,61	9,34	30,01	0,52	0,59	0,13	0,05	11,97	12,17	0,80	2,31	12,76	0,17

3.3 Espécies arbóreas

As espécies arbóreas selecionadas para a realização da amostragem de solo sob suas copas foram escolhidas em função da representatividade nas áreas de estudo e a potencialidade de fixação biológica de nitrogênio em simbiose com bactérias diazotróficas. Assim, as espécies estudadas foram: *Andira anthelmia* (Vell.) J.F. Macb., *Inga edulis* Mart., *Inga striata* e *Pterocarpus rorhii* Vahl..

3.3.1 Espécies florestais da Família Fabaceae (Leguminosae)

Alguns trabalhos sobre nodulação em leguminosas arbóreas, como Faria et al. (1986), Faria et al. (1987), Barberi et al. (1998), Grossman et al. (2005), e Canosa et al. (2012), demonstram a importância de diversas espécies, como *Andira anthelmia* (Vell.) J.F. Macb., *Inga edulis* Mart., *Inga striata* Benth. e *Pterocarpus rorhii* Vahl. na recuperação de áreas degradadas e no processo de restauração florestal. Ainda que existam questionamentos acerca da nodulação de *P. rorhii*, existem registros do seu potencial em formar nódulos (Canosa et al., 2012).

3.3.1.1 *Andira anthelmia* (Vell.) J.F. Macb.

Pertence à família Fabaceae (Faboideae), nativa e endêmica do Brasil, ocorre nos biomas Cerrado e Mata Atlântica (Pennington, 2003).

Planta pioneira rústica, ótima para plantios mistos destinados a recomposição de áreas degradadas. Semidecídua, heliófita, seletiva higrófila, característica das florestas semidecídua e pluvial. Ocorre preferencialmente em fundo de vales e encostas úmidas, tanto no interior da floresta primária densa como em formações abertas secundárias. Apresenta dispersão ampla, porém sempre em baixa densidade populacional. Produção de sementes viáveis irregular e em pequena quantidade, amplamente disseminados pela fauna. Floresce durante os meses de outubro-novembro. Seus frutos amadurecem nos meses de fevereiro-março (Lorenzi, 1992).

3.3.1.2 *Inga edulis* Mart.

Pertence à família Fabaceae (Mimosoideae), nativa não endêmica do Brasil, ocorre nos biomas Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (Pennington, 1997).

Planta semidecídua, heliófita, seletiva higrófila, pioneira, característica da floresta pluvial tropical. Ocorre principalmente em capoeiras localizadas sobre solos de baixadas que durante o período chuvoso alagam-se com facilidade. Produz anualmente abundante quantidade de sementes viáveis. Floresce durante os meses de outubro a janeiro e os frutos amadurecem a partir do mês de maio (Lorenzi, 1998).

3.3.1.3 *Inga striata* Benth.

Pertence à família Fabaceae (Mimosoideae), nativa e não endêmica do Brasil, ocorre nos biomas Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica (Pennington, 1997).

Vegetação secundária, ocorre em florestas ombrófila densa, submontana e montana e em floresta estacional. Frequentemente inicia a floração em outubro, frutificando no final de fevereiro até junho. Pode apresentar mais de uma floração ao ano. Ocorre ao longo da costa brasileira e penetra no continente na região Sul/Sudeste do país (Pennington 1997; Garcia 1998).

3.3.1.4 *Pterocarpus rorhii* Vahl.

Pertence à família Fabaceae (Papilionoideae), nativa e não endêmica do Brasil, ocorre nos biomas Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica (Rojo, 1972).

Planta pernifolia, heliófita, anemocórica, característica da floresta pluvial da encosta atlântica. Encontrada tanto na floresta primária densa como nas formações secundárias. Floresce a partir de meados de outubro a dezembro. Frutificação ocorre durante os meses de maio a julho (Lorenzi, 1998; Carvalho, 2008).

4 LITERATURA CITADA

ADNAN, A.F.M.; TAN, I.K.P. Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential. *Bioresource Technology*, v.98, n.7, p.1380-1385, 2007.

AMANN, R.L.; LUDWIG, W. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microbiology Reviews: Amsterdam*, v.24, p.555-565, 2000.

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

BARBERI, A.; CARNEIRO, M.A.C.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Nodulação em leguminosas florestais em viveiro no sul de Minas Gerais. *Cerne: Lavras*, v.4, p.145-153, 1998.

BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; Dinâmica e função da matéria orgânica. In: SANTOS, G.A.; SILVA, L.S.; CANELLAS, L.P.; CAMARGO, F.A.O. (Eds). *Fundamentos da matéria orgânica – Ecossistemas tropicais e subtropicais*. 2.ed. Porto Alegre: Metropole, 2008. 645p

BORGO, M. Floresta Atlântica do litoral norte do Paraná, Brasil: aspectos florísticos, estruturais e estoque de biomassa ao longo do processo sucessional. 165 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

BRANDÃO-JUNIOR, O.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; ESPINDOLA, C.R. Comparação entre os métodos de fumigação-extração e fumigação-incubação para determinação do carbono da biomassa microbiana em um Latossolo. *Rev. Bras. Ciênc. Solo*, Viçosa, v.32, n. 5, p. 1911-1919, 2008.

BRASIL. Decreto Nº 5.746, de 5 de abril de 2006. Regulamenta o artigo 21 da Lei nº 9.985, de 18 de julho, que dispõe sobre o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza. Diário Oficial, Brasília, DF, 5 abr. 2006. Seção 1, p.1.

BREMNER, J.M. Organic nitrogen soils. In: BARTHOLOMEW, W.V. (Ed.) Soil nitrogen. Madison: ASA/ SSSA, 1965. p. 93-149.

CAMARGO, F.A.O.; GIANELLO, M.J.T.; VIDOR, C. Nitrogênio orgânico no solo. In: SANTOS, G.A.; CAMARGO, F.A.O. (Eds) Fundamentos da matéria orgânica – Ecossistemas tropicais e subtropicais. Porto Alegre: Genesis, 1999. 508p

CANOSA, G.A.; FARIA, S.M.; MORES, L.F.D. Leguminosas florestais da Mata Atlântica brasileira fixadoras de nitrogênio atmosférico. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2012, 12p. (Comunicado Técnico, 144).

CARDOSO, E. L.; SILVA, M. L. N.; MOREIRA, F. M. S.; CURI, N. Atributos Biológicos Indicadores da Qualidade do Solo em Pastagem Cultivada e Nativa no Pantanal. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.44, n.6, p.631-637, 2009.

CARVALHO, P. E. R. Espécies arbóreas brasileiras. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008, v. 3, 593 p.

COLWELL, R.R. Microbial diversity: the importance of exploration and conservation. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., v.18, 302-307, 1997.

CONSERVATION INTERNATIONAL DO BRASIL; FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; FUNDAÇÃO BIODIVERSITAS; INSTITUTO DE PESQUISAS ECOLÓGICAS; SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE DO ESTADO DE SÃO PAULO; SEMAD/INSTITUTO ESTADUAL DE FLORESTAS-MG. Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos. Brasília: MMA/SBF, 2000. 40p

DE-POLLI, H.; GUERRA, J.G.M.. Carbono, nitrogênio e fósforo na biomassa microbiana do solo. In: SANTOS, G.A.; SILVA, L.S.; CANELLAS, L.P.; CAMARGO, F.A.O. (Eds). Fundamentos da matéria orgânica – Ecossistemas tropicais e subtropicais. 2.ed. Porto Alegre: Metropole, 2008. 645p.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: Embrapa-SPI, 1995. 60 p.

FAORO, H. Determinação da biodiversidade da Archaea e Bactéria da Mata Atlântica Paranaense. 183 p. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

FARIA, S.M.; FRANCO, A.A. Identificação de bactérias eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies leguminosas arbóreas. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 16p., 2002. (Documento 158).

FARIA, S.M.; LIMA, H.C; FRANCO, A.A.; MUCCI, E.S.F.; SPRENT, J.I. Nodulation of legume trees from South East Brazil. *Planta and soil*, v.99, 347-356, 1987.

FARIA, S.M.; SUTHERLAND, J. M.; SPRENT, J.I. A new type of infected cell in root nodules of *Andira* spp. (Leguminosae). *Plant Science*, v.45, p.143-147, 1986.

FERREIRA, A.S.; CAMARGO, F.A.O.; VIDOR, C. Utilização de microondas para avaliação da biomassa microbiana do solo. *R. Bras. Ci.Solo*, Viçosa, 23: 991-996, 1999.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica período 2012-2013. São Paulo, 2014. 61p.

GALLOWAY, J.; TOWNSEND, A.; ERISMAN, J.W.; BEKUNDA, M.; CAI, Z.; FRENEY, J.R.; MARTINELLI, L.A.; SEITZINGER, S.P.; SUTTON, S. Transformation of the Nitrogen Cycle: Recent Trends, Questions, and Potential Solutions. *Science*, Washington, v. 320, p. 889-892, 2008.

GAMA-RODRIGUES, E.F.; GAMA-RODRIGUES, A.C. Biomassa microbiana e ciclagem de nutrientes. In: SANTOS, G.A.; SILVA, L.S.; CANELLAS, L.P.; CAMARGO, F.A.O. (Eds). Fundamentos da matéria orgânica – Ecossistemas tropicais e subtropicais. 2.ed. Porto Alegre: Metropole, 2008. 645p.

GARCIA, F.C.P. Relações sistemáticas e fitogeográficas de *Inga Miller* (Leguminosae-Mimosoideae) nas florestas da costa sul e sudeste do Brasil. Rio Claro, Universidade Estadual Paulista (Tese de Doutorado), 1998.

GROSSMAN, J.M.; SHEAFFER, C.; WYSE, D.; GRAHAM, P.H. Characterization of slow-growing root nodule bacteria from *Inga oerstediana* in organic coffee agroecosystems in Chiapas, Mexico. *Applied and Soil Ecology*: Amsterdam, v.29, p.236-251, 2005.

HUNTER-CEVERA, J. C. The Value of Microbial Diversity. *Current Opinion in Microbiology*, v.1, p.278-285, 1998.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Mapa de Biomas do Brasil, primeira aproximação. Rio de Janeiro: IBGE, 2004. Disponível em <www.ibge.gov.br> Acesso em 04 fev. 2016.

INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ. Dados sobre RPPN no estado do Paraná. Disponível em: <<http://www.iap.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=1232>> Acesso em 22 mar. 2016.

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

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

KUSS, A. V. Fixação de Nitrogênio por Bactérias Diazotróficas em Cultivares de Arroz Irrigado. 97 f. (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Santa Maria – Santa Maria, 2006.

LAMBAIS, R.R; CURY, J.C.; MALUCHE-BARETTA, C.; BULL, R.C. Diversidade Microbiana no Solos: Definindo Novos Paradigmas. In: VIDAL-TORRADO, P.; ALLEONI, L.R.F.; COOPER, M.; SILVA, A,P.; CARDOSO, E.J.. (Ed.). Tópicos em ciência do solo. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. 2005. v.4, p.43-84.

LANE, D.; PACE, B.; OLSEN, G. STAHL, D. SOGIN, M. PACE, N. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, v.82, n.20, p.6955-6959, 1985.

LEWIS, G.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. Legumes of the World. Kew, Royal Botanic Gardens. 2005.

LIESACK, W.; JANSSEN, H. P.; RAINEY, F. A.; WARD-RAINEY, N. L.; STACKEBRANDT, E. Microbial diversity in soil: the need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. In: Modern Soil Microbiology. VAN ELSAS, J. D.; TREVORS, J. T.; WELLINGTON, E. M. H. Marcel Dekker, Inc. New York, 712p, 1997.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Editora Plantarum Ltda. Nova Odessa, São Paulo vol. 1, 1992, 368 p.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1998. v.1, 360 p.

MARCHIORI JR. M.; MELO, W.J. Carbono, carbono da biomassa microbiana e atividade enzimática em um solo sob mata natural, pastagem e cultura do algodoeiro. R. Bras. Ci Solo, v. 23, p.257-263, 1999.

MITTERMEIER, R.A.; FONSECA, G.A.B.; RYLANDS, A.B.; BRANDON, K. A Brief History of Biodiversity Conservation in Brazil. *Conservation Biology*, v.19, n.3, p.601-607, 2005.

MOCALI, S.; BENEDETTI, A. Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. *Research in Microbiology*, v.161, n.6, p.497-505, 2010.

MONTEIRO, M.T. & GAMA-RODRIGUES, E.F. Carbono, nitrogênio e atividade da biomassa microbiana em diferentes estruturas de serapilheira de uma floresta natural. *R. Bras. Ci. Solo*, 28:819-826, 2004.

MOREIRA, F.M.S.; CARES, J.E.; ZANETTI, R.B.; STÜRMER, S.L. O ecossistema solo: componentes, relações ecológicas e efeitos na produção vegetal. In: Moreira, F.M.S.; CARES, J.E.; ZANETTI, R.B.; STÜRMER, S.L. O ecossistema solo. Lavras: Ed. Ufla, 2013. p.15-30.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. 2.ed. Lavras: UFLA, 2006. 729p.

MÜLLER, F.C. Parâmetros químicos e microbiológicos do solo em áreas de restauração florestal na Reserva Natural Rio Cachoeira, Antonina-PR. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

O'DONNELL, A. G.; GÖRES, H. E. 16S rDNA methods in soil microbiology. *Current Opinion in Biotechnology*: Amsterdam, v. 10, n. 3, p. 225-229, 1999.

OADES, J.M.; JENKINSON, D.D. Adenosine triphosphate content of the soil microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.11, p. 201-204, 1979.

PARROTTA, J.A. Secondary forest regeneration on degraded tropical lands: the role of plantations as “foster ecosystem”. In: LIETH, H. LOHMANN, M. (Eds.) Restoration of tropical forest ecosystem. The Hague: Kluwer Academic Publishers, 1993, p. 63-73.

PAUL, E.A.; CLARK, F.E. Soil microbiology and biochemistry. New York: Academic Press, 1996. 340p.

PENNINGTON, R. T. Monograph of *Andira* (Leguminosae-Papilionoideae). p.143. 2003.

PENNINGTON, T.D. The genus *Inga* – Botany. Kew, Royal Botanic Gardens. p.844. 1997.

PEREIRA, J. C., NEVES, M. C. P., DROZDOWICZ, A. Quantificações das Populações de Bactérias em Geral, de Bactérias Resistentes a Antibióticos e de Actinomicetos em Solos. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1996, 21p.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Research in Microbiology: Paris*, v. 51, n. 3, p. 167–177, 2000.

REED, S.C.; CLEVELAND, D.C.; TOWNSEND, A.R.; NEMERGUT, D.R. Microbial community shifts influence patterns in tropical Forest Nitrogen Fixation. *Oecologia, Marburg*, v.164, p. 521-531, 2010.

RODRIGUES, R.R.; BRANCALION, P.H.S.; ISERNHAGEM, I. Pacto pela restauração da mata atlântica: referencial dos conceitos e ações de restauração florestal. São Paulo: LERF/ESALQ - Instituto BioAtlântica, 2009. 256p.

RODRIGUES, R.R.; GANDOLFI, S. Conceitos, tendências e ações para recuperação de florestas ciliares. In: RODRIGUES, R. R.; LEITÃO-FILHO, H. de F. (eds.). *Matas ciliares: conservação e recuperação*. São Paulo: EDUSP, 2004. p. 235-247.

ROJO, J. P. Pterocarpus (Leguminosae–Papilionaceae). *Phanerog. Monogr*, v.5, p.1–119, 1972.

ROSSELÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Review: Amsterdam*, v. 25, n. 1, p. 39-67, 2001.

SCHMEISSER, C.; STEELE, H.; STREIT, W. R. Metagenomics, biotechnology with nonculturable microbes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 75, n. 5, p. 955-962, 2007.

SCHNITZER, M. Soil organic matter-the next 75 years. *Soil Science, Baltimore*, 151: 41-58, 1991.

SHIMIZU, J.Y. Estratégia complementar para conservação de espécies florestais: resgate e conservação de ecótipos ameaçados. *Pesquisa Florestal Brasileira*. n.54, p. 07-35, 2007.

SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. *Biotechnology do solo: Fundamentos e Perspectivas*. Brasília: MEC Ministério da Educação, ABEAS; Lavras: ESAL, FAEPE, 1988. 236p.

SIQUEIRA, J.O.; SOARES, C.R.F.S.; SILVA, C.A. Matéria orgânica em solos de áreas degradadas. In: SANTOS, G.A.; SILVA, L.S.; CANELLAS, L.P.; CAMARGO, F.A.O. (Eds). *Fundamentos da matéria orgânica – Ecossistemas tropicais e subtropicais*. 2.ed. Porto Alegre: Metropole, 2008. 645p

SPVS - SOCIEDADE DE PESQUISA EM VIDA SELVAGEM E EDUCAÇÃO AMBIENTAL. Relatório anual 2014. Disponível em: <http://www.spvs.org.br/wp-content/uploads/downloads/2015/07/Rel_FINAL2014.pdf> Acesso em 02 mar. 2016.

SPVS - SOCIEDADE DE PESQUISA EM VIDA SELVAGEM E EDUCAÇÃO AMBIENTAL. Plano de manejo da Reserva Natural da Guaricica. Volume 1, Encartes I, II e III. 2005. 310 p.

SPACCINI, R.; PICCOLO, A.; MBAGWU, J.S.C.; ZENA, T.A.; IGWE, C.A. Influence of the addition of organic residues on carbohydrate content and structural stability of some highland soil in Ethiopia. *Soil Use Manage*, Stirling, v. 18, p. 404 – 411, 2002.

SPARLING, G.P. Ratio of microbial biomass carbon to soil organic carbon as a sensitive indicator of changes in soil organic matter. *Australian Journal of Soil Research*, Victoria, v.30, p. 195-207, 1992.

SPARLING, G.P.; WEST, A.W. A direct extraction method to estimate soil microbial C: calibration in situ using microbial respiration and ¹⁴C labelled cells. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.20, p. 337-343, 1988.

STEVENSON, F. J. Humus chemistry - genesis, composition, reaction. New york: J. Wiley, 1982. 443 p.

TATE, K. R.; ROSS, D. J.; FELTHAM, C. W. A direct extraction method to estimate soil microbial - C – effects of experimental – variables and some different calibration procedures. *Soil Bio. & Bioch.*, Oxford, 20: 329-335, 1988.

THENG, B.K.G.; TATE, K.R. & SOLLINS, P. Constituents of organic matter in temperate and tropical soils. In: COLEMAN, D.C.; OADES, J.M. & UEHARA, G., eds. Dynamics of soil organic matter in tropical ecosystems. Hawaii, NifTAL Project, p.5-32, 1989.

VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass-C. *Soil Bio. & Bioch.*, 19:703-707, 1987.

WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, v.173, p. 697-703, 1991.

WOESE, C.R. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, v.51, p.221-271, 1987.

YANNI, Y.G.; RIZK, R.Y.; CORICH, V.; SQUARTINI, A.; NINKE, K.; PHILIP-HOLLINGSWORTH, S.; ORGAMBIDE, G.; BRUIJN, F.D.; STOLTZFUS, J.; BUCKLEY, D.; SCHMIDT, T.M.; MATEOS, P.F.; LADHA, J.K.; DAZZO, F.B. Natural endophytic associations between *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. *Plant and Soil*, v.194, p.99-114, 1997.

CAPÍTULO 2 – BIOMASSA E ATIVIDADE MICROBIANA EM SOLOS SOB ESPÉCIES NATIVAS LEGUMINOSAS EM ÁREAS DE REGENERAÇÃO NATURAL NA MATA ATLÂNTICA DO SUL DO BRASIL

RESUMO

A manutenção da produtividade dos ecossistemas florestais depende, em grande parte, do processo de transformação da matéria orgânica do solo e consecutivamente da dinâmica da Biomassa Microbiana do Solo (BMS). Por outro lado, as características da BMS são indiretamente determinadas pela própria vegetação florestal. Assim, é de se esperar que a presença de diferentes espécies florestais sobre o solo pode influenciar a BMS e a atividade microbiana. Neste trabalho foram avaliados o conteúdo de C e N da biomassa microbiana, a Respiração Basal do Solo (RBS) e quociente metabólico (qCO_2), a fim de se compreender melhor as relações entre parâmetros microbiológicos do solo e algumas espécies leguminosas nativas da Mata Atlântica do Sul do Brasil, em áreas de restauração florestal. A extração do Carbono da Biomassa Microbiana e N microbiano foi realizada pelo método de irradiação-extração, a RBS por incubação das amostras com retenção de CO_2 por NaOH e o qCO_2 pela razão entre RBS e CBM. Para o CBM e N_{mic} , os maiores valores foram observados nos solos sob as espécies *Inga edulis* e *Andira anthelmia*, na camada de 0 a 5 cm de profundidade. RBS apresentou maiores taxas no outono, com valores superiores na camada superficial. Menores valores obtidos para qCO_2 na primavera refletiram em maior eficiência da BM em utilizar o carbono disponível para biossíntese, servindo como indicador de que, neste período, o ecossistema encontrava-se mais estável, ou seja, em estado favorável a sua manutenção. Quanto às espécies, observou-se que *A. anthelmia* e *I. edulis* favoreceram o crescimento da comunidade microbiana. A RBS com maiores taxas no outono, período com menor umidade, refletiu na maior dificuldade no metabolismo microbiano, fazendo com que o solo perdesse C na forma de CO_2 . Assim, conclui-se que a atividade microbiológica do solo se mostrou influenciada tanto pelas condições climáticas como por algumas espécies arbóreas.

Palavras-Chave: Biomassa microbiana do solo, carbono da biomassa microbiana, nitrogênio microbiano, respiração basal do solo e quociente metabólico.

1 INTRODUÇÃO

Em diferentes condições ambientais de umidade, aeração, pH, disponibilidade de C, N, P e S, a biomassa microbiana do solo (BMS) é variável. A sua estimativa, em um tempo determinado, vem sendo usada para complementar a compreensão de avaliações do fluxo de carbono e nitrogênio, da ciclagem de nutrientes e da produtividade das plantas em diferentes ecossistemas terrestres. Tais avaliações servem ainda como base para estudos de formação e ciclagem da matéria orgânica do solo (Roscoe et al., 2006; Gama-Rodrigues & Gama-Rodrigues, 2008).

Como parâmetro ecológico, estudos acerca da BMS fornecem rapidamente informações sobre mudanças nas propriedades orgânicas do solo, detectam mudanças em razão da devastação florestal, aferem a regeneração dos solos após a remoção da camada superficial, assim como avaliam os efeitos de poluentes como metais pesados, pesticidas, entre outros (Frighetto, 2000). Assim a medição da biomassa microbiana e de sua atividade nos solos torna-se importante ferramenta na avaliação do estado de conservação dos ecossistemas.

A BMS representa, proporcionalmente, a menor fração do C orgânico do solo, mas se constitui como parte significativa e potencialmente mineralizável do N disponível às plantas; é de rápida ciclagem; responde intensamente às flutuações sazonais, tendo, assim, influência no ciclo global do C e N (White & Gosz, 1987).

O carbono da biomassa microbiana (CBM) representa a quantidade de C imobilizada pela biomassa microbiana em suas células, ou seja, compreende a fração ativa e biodegradável da MOS. Sua determinação ajuda na identificação de tendências de mudanças a médio e longo prazo nas frações de ciclagem mais lenta, refletindo, assim, possíveis impactos ambientais (Feigl et al., 1998; Insam, 2001).

O conteúdo de N da massa microbiana do solo representa, em média, de 1 a 5% do N total do solo (De-Polli & Guerra, 2008), é liberado na medida em que os microrganismos morrem e são mineralizados pela população restante; assim, em solos submetidos a estresses ambientais, a maior parte do N mineralizado pode ser de origem microbiana (Marumoto et al., 1982).

Além da determinação da BMS, são necessárias avaliações de parâmetros relativos a sua atividade para verificar o seu estado e potencial metabólico, pois podem haver elevadas quantidades de biomassa no entanto inativas (Tótola & Chaer, 2002).

A participação dos microrganismos na decomposição aeróbia da MOS compreende a principal fonte superficial do solo de CO₂. Este processo é conhecido como respiração do solo (Moreira & Siqueira, 2006) e pode ser avaliada pelo método da Respiração Basal do Solo (RBS), ou seja, liberação de C-CO₂ em amostras coletadas no campo, onde a quantidade de carbono liberado serve com um indicativo do carbono lábil ou prontamente metabolizável do solo (Doran & Parkin, 1996).

A razão entre o CO₂ evoluído e o reservatório CBM fornece o quociente metabólico (qCO_2). Este parâmetro, que refere-se à quantidade de CO₂ incorporada por grama de biomassa em um determinado tempo, reflete o estado metabólico dos microrganismos, podendo ser indicador de estresse ou estabilidade do ecossistema. Sua proposição teve como objetivo avaliar os efeitos antropogênicos e ambientais sobre a atividade microbiana no solo e assim poder indicar o grau de desenvolvimento e reabilitação de um ecossistema (Anderson & Domsch, 1993; De-Polli & Guerra, 1997).

Como a BMS apresenta estreita relação com a matéria orgânica adicionada sobre o solo (Gama-Rodrigues & Gama-Rodrigues, 2008), a hipótese deste trabalho é de que a presença de diferentes espécies florestais sobre o solo pode atuar sobre a BMS e sua atividade nos sítios avaliados. Em trabalho anterior (Müller, 2012) com apenas duas espécies em estudo, esta hipótese não foi confirmada. Aqui, buscou-se ampliar o número de sítios e espécies florestais em estudo, sendo avaliados o conteúdo de C e N da biomassa microbiana, associando-os aos parâmetros microbiológicos de Respiração Basal do Solo e quociente metabólico, a fim de observar se há relação entre a microbiota e as espécies leguminosas nativas em áreas de Mata Atlântica no Sul do Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Clima na área no período de estudo

A amostragem de solo foi realizada na primeira quinzena dos meses de abril (outono) e outubro (primavera) do ano de 2015, com precipitação acumulada e temperaturas médias conforme Figura 1.

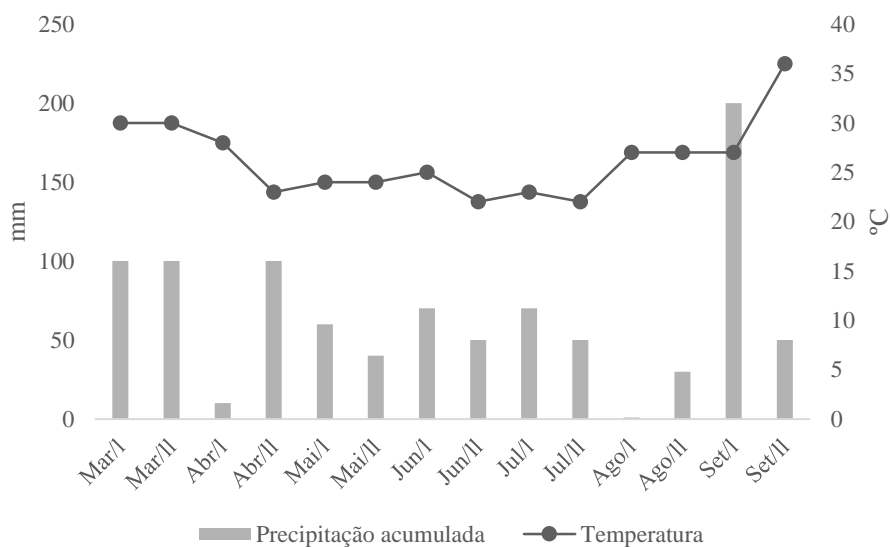


Figura 1. Dados de precipitação acumulada e temperaturas em Antonina, PR (I refere-se as médias de precipitação da primeira quinzena do mês e II refere-se as médias de precipitação da segunda quinzena do mês). Fonte de dados: Simepar (2015).

2.2 Coletas de solo e acondicionamento das amostras

Foram definidos dois pontos de coleta na projeção da copa das árvores, entre 1 e 2 metros do tronco. Nestes pontos, foi retirada a serapilheira depositada e, com auxílio de pá cortadeira, retirou-se um monólito de solo de onde foram extraídas as amostras de solo nas profundidades de 0-5 e 5-10 cm. As duas amostras de solo, de cada camada, foram agrupadas em uma única amostra composta por profundidade e por árvore.

Os solos foram coletados sob 12 indivíduos de *Andira anthelmia*, 12 indivíduos de *Pterocarpus rohrii*, 10 indivíduos de *Inga edulis* e oito indivíduos de *Inga striata*, em duas profundidades, totalizando 84 amostras.

As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Biogeoquímica, onde ficaram acondicionadas à temperatura de 5°C por sete dias.

2.3 Determinação do peso seco do solo

O peso seco foi determinado em duplicatas das amostras de solo, pelo método de secagem em estufa à 105°C até peso constante.

2.4 Determinação do Carbono da Biomassa Microbiana (CBM) e Nitrogênio microbiano (N_{mic}) do Solo

As análises foram realizadas no Laboratório de Biogeoquímica do Departamento de Solos e Engenharia Agrícola da Universidade Federal do Paraná.

No laboratório, as amostras foram peneiradas em malha de 2 mm, retirando-se os fragmentos de animais e vegetais por meio de catação.

A extração do Carbono da Biomassa Microbiana do solo e do Nitrogênio microbiano foram realizadas pelo método de irradiação-extração, por ser o mais indicado para solos ácidos e com elevados teores de matéria orgânica. Para cada amostra, foram pesadas duas alíquotas de 40g de solo e colocadas em frascos plásticos de 200 mL. Em seguida, uma das alíquotas foi irradiada em forno micro-ondas marca Sanyo Prosdócimo, modelo EM 9003 B, tensão de alimentação 120 V (60 Hz), frequência de micro-ondas de 2.450 MHz e concentração de energia 1,35 kW, durante 120 segundos.

Após a irradiação, foram adicionados a todos os frascos 50 mL de K_2SO_4 0,5 mol L^{-1} (Vance et al., 1987), seguido de agitação por 30 minutos em agitador orbital a 220 rpm. Após a decantação do solo, retirou-se o sobrenadante passando-o em filtro de papel acoplado a um funil e frasco para acondicionar as soluções.

O CBM e N_{mic} foram determinados no Analisador Elementar vario TOC cube (Figura 2). O cálculo do C da biomassa microbiana do solo foi dado pela diferença de C encontrado na amostra irradiada e o C recuperado na amostra não irradiada, aplicando o fator de correção de 0,45 (De-Polli & Guerra, 1996), representados na seguinte equação:

$$CBM = (CFI - CNFI) / Kc = \text{mg C kg}^{-1} \text{ de solo}$$

em que CBM= carbono presente na biomassa microbiana do solo; CFI = carbono presente na amostra irradiada; CNFI = carbono presente na amostra não irradiada; Kc = fator de correção.

O cálculo do conteúdo de N microbiano do solo foi dado pelo fluxo obtido da diferença entre a quantidade de N total recuperado no extrato da amostra irradiada e o recuperado da amostra não irradiada, aplicando o fator de correção de 0,54 (De-Polli & Guerra, 2008), representados na seguinte equação:

$$N_{mic} (mg\ kg^{-1}) = FN_t \cdot k_N^{-1}$$

Onde N_{mic} = nitrogênio microbiano do solo; FN_t = diferença entre quantidades de N obtidas nas amostras irradiada e não irradiada; k_N = fator de correção.



Figura 2. Colocação dos extratos irradiados e não irradiados para determinação do CBM e N_{mic} (A) e equipamento em funcionamento (B).

2.5 Determinação da Respiração Basal do Solo (RBS)

A determinação da respiração basal do solo seguiu a metodologia de incubação das amostras com retenção de CO_2 por NaOH 1 mol L^{-1} (Jenkinson & Powlson, 1976). Pesou-se 50 g de solo, previamente peneirados em malha de 2 mm, em potes de 600 mL; posteriormente foi colocado um recipiente contendo 10 mL de NaOH 1 mol L^{-1} e um tubo de ensaio contendo 10 mL de água deionizada, a fim de manter a umidade das amostras durante o período de incubação. Os potes foram fechados hermeticamente para que não houvesse entrada de CO_2 do ar externo ou fuga do CO_2 internamente produzido. Foram preparados seis frascos controle (branco), contendo apenas a solução de NaOH e água deionizada. Após preparo das amostras, incubou-se à temperatura constante de 25°C durante 10 dias (Figura 3).

Após o período de incubação foram retirados os frascos contendo NaOH , e imediatamente adicionados 2 mL de BaCl_2 , afim de completar a precipitação do CO_2 . Logo após, titulou-se esta solução com HCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, utilizando-se como indicador uma solução de fenolftaleína 1%.

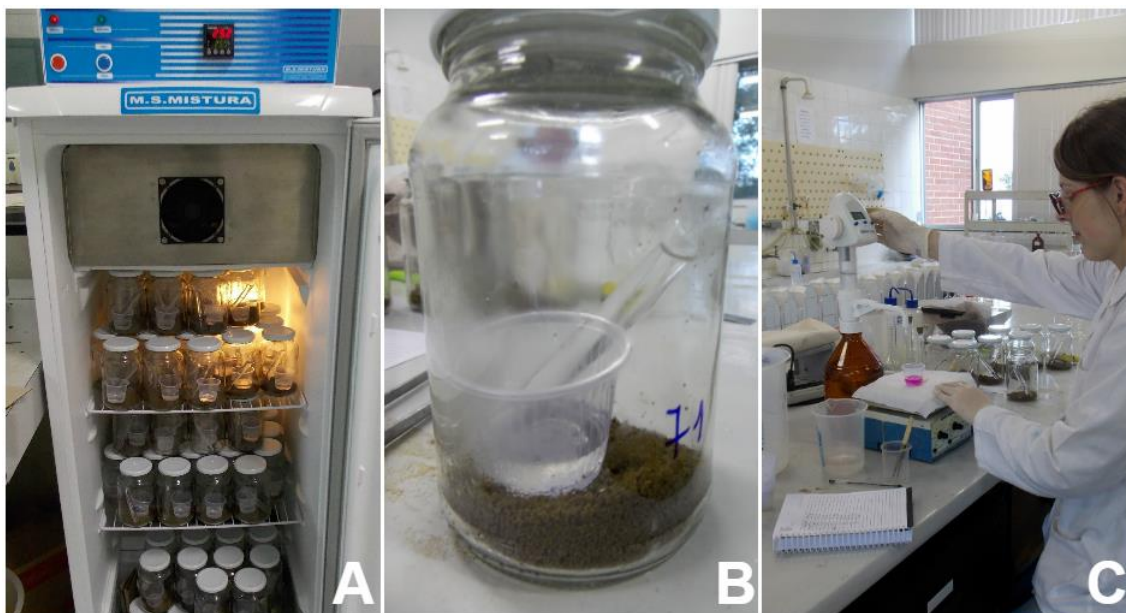


Figura 3. Incubação das amostras (A), amostra após período de incubação (B) e titulação do NaOH (C).

O cálculo da RBS é representado na seguinte equação:

$$\text{RBS} = \frac{((V_b - V_a) \cdot M \cdot 6.1000) / P_s}{T}$$

em que RBS= carbono oriundo da respiração basal do solo; V_b (mL) = volume do ácido clorídrico gasto na titulação da amostra em branco; V_a (mL) = volume do ácido clorídrico gasto na titulação da amostra; M= molaridade exata do HCl; P_s (g) = massa de solo seco e T= tempo de incubação da amostra em horas.

2.6 Quociente Metabólico ($q\text{CO}_2$)

O quociente metabólico foi calculado pela razão entre a respiração basal do solo por unidade de carbono da biomassa microbiana do solo. O cálculo do $q\text{CO}_2$ da respiração basal do solo é:

$$q\text{CO}_2 = \frac{\text{RBS (mg C-CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \text{ solo h}^{-1})}{\text{CBM (mg C} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ solo) } 10^{-3}}$$

Onde, $q\text{CO}_2$ (quociente metabólico), CBM (concentração de carbono da biomassa) e RBS (respiração basal).

2.7 Análises estatísticas

Foi adotado o delineamento inteiramente casualizado, sendo os tratamentos representados pelas espécies em estudo e as repetições pelo número de indivíduos sob os quais foram realizadas as coletas de solo.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre as médias foram asseguradas pelo teste de Tukey (5% de probabilidade).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Carbono da Biomassa Microbiana

O Carbono da Biomassa Microbiana, nas duas estações estudadas, não apresentou diferenças entre as espécies (Tabela 1 e 2), porém, ao considerar as profundidades coletadas, verificou-se que no outono, sob *Andira anthelmia* e *Inga edulis* a biomassa microbiana foi maior, com valores de 40,34 e 38,26 mg C kg⁻¹ de solo nas camadas superficiais, e na camada de 5 a 10 cm, valores de 23,30 e 23,61 mg C kg⁻¹ (Figura 4).

Esta estimativa da biomassa microbiana serve como um indicador biológico dos níveis da matéria orgânica do solo (Mele & Carter, 1993; Gama-Rodrigues, 1999) e somado a isso, a incorporação de C pela microbiota do solo.

Tabela 1. Valores médios de CBM sob espécies leguminosas em diferentes profundidades no outono e primavera. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.

Espécie	CBM (mg C kg ⁻¹ de solo)	
	Outono	Primavera
<i>Andira anthelmia</i>	31,82 a	278,67 a
<i>Inga edulis</i>	30,92 a	264,59 a
<i>Inga striata</i>	25,89 a	285,86 a
<i>Pterocarpus rohrii</i>	33,92 a	306,67 a

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 2. Valores médios de CBM sob espécies leguminosas nas profundidades de 0 a 5 e 5 a 10 cm na primavera. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.

Espécie	CBM (mg C kg ⁻¹ de solo)	
	0-5	5-10
<i>Andira anthelmia</i>	251,69 a	275,75 a
<i>Inga edulis</i>	273,82 a	255,37 a
<i>Inga striata</i>	283,96 a	287,76 a
<i>Pterocarpus rohrii</i>	319,24 a	294,10 a

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

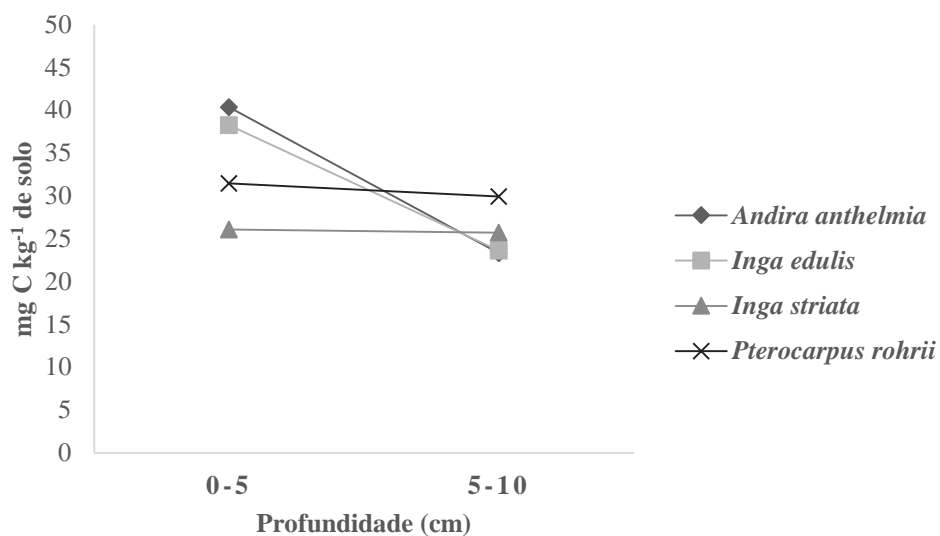


Figura 4. Valores médios de CBM sob espécies leguminosas nas profundidades de 0 a 5 e 5 a 10 cm no outono. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.

Ao comparar as duas estações observa-se valores muito superiores na primavera comparativamente ao outono (Figura 5). Tais resultados vão de encontro ao estudo de Silva et al. (2012), onde foi observado maiores valores para CBM em período úmido em floresta secundária da Mata Atlântica, no estado do Rio de Janeiro.

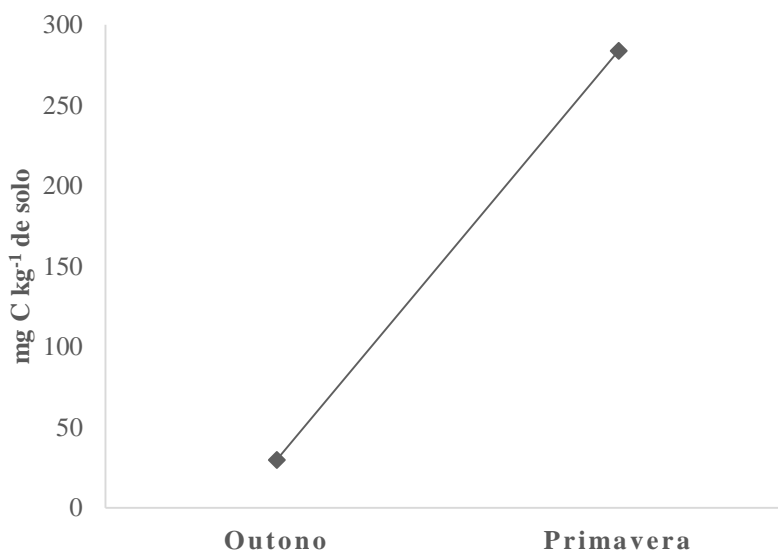


Figura 5. Valores médios de CBM nas diferentes estações avaliadas, sob espécies leguminosas. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.

O aumento do carbono da biomassa microbiana na primavera pode ser relacionado às melhores condições climáticas para o crescimento de microrganismos, além do aumento da disponibilidade de nutrientes em decorrência da maior decomposição da matéria orgânica (Gama-Rodrigues et al., 2005). Parte da BMS morre nos períodos mais secos e com a retomada das chuvas, e conseqüente aumento da umidade do solo, a biomassa sobrevivente faz uso da MO acumulada no período anterior, inclusive células de BM morta, promovendo, assim, maior atividade microbiana nos períodos de maior pluviosidade (Piao et al., 2000).

As variações relatadas neste estudo vão de encontro ao que foi verificado por Diaz-Raviña e colaboradores (1995), onde a sazonalidade influenciou as flutuações da população microbiana em ecossistemas florestais.

3.2 Nitrogênio microbiano

Avaliando os teores de nitrogênio microbiano no outono, é possível observar a distinção quanto às espécies sob as áreas de coleta, onde, sob *Inga edulis* e *Andira anthelmia* observam-se os maiores valores de N_{mic} , da ordem de 5,29 e 5,66 mg N_{mic} kg⁻¹ de solo, seguidas por *Pterocarpus rohrii* e *Inga striata* com 4,16 e 2,25 mg N_{mic} kg⁻¹ de solo, respectivamente. Na primavera também foram identificadas diferenças nos valores de N_{mic} entre espécies, mas aquela que superou as demais foi *P. rohrii* (Tabela 3). E os valores absolutos na primavera foram superiores àqueles do outono, o que confere função de reserva à biomassa microbiana, nesta estação, acumulando maiores quantidades de nutrientes (Gama-Rodrigues, 1999).

Ao comparar as profundidades avaliadas, não encontraram-se grandes variações nos valores de N microbiano. Apenas para *Andira anthelmia* foi observado distinções, com valores superiores na camada superficial em relação a camada de 5 a 10 cm (Tabela 4). No entanto, observa-se uma tendência de maiores teores de N_{mic} , sob todas as espécies, na profundidade de 0 a 5 cm. Isso evidencia que nas camadas superficiais pode ocorrer maior aporte de N proveniente dos exsudatos de raízes e de resíduos vegetais na superfície do solo que são imobilizados pela microbiota do solo (Cheng & Johnson, 1998). As estáveis propriedades físico-químicas da rizosfera, decorrentes do fornecimento constante de substratos orgânicos e fatores de crescimento pelas plantas, favorecem intensa atividade metabólica dos microrganismos associados, influenciando direta e

positivamente o tempo de geração microbiano (Moreira & Siqueira, 2002). Este aumento reflete diretamente no enriquecimento dos níveis de nitrogênio da biomassa microbiana no solo.

Tabela 3. Valores médios de N mic sob espécies leguminosas no outono e primavera. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.

Espécie	N mic (mg N _{mic} kg ⁻¹ de solo)	
	Outono	Primavera
<i>Andira anthelmia</i>	5,66 a	46,11 b
<i>Inga edulis</i>	5,29 a	47,55 ab
<i>Inga striata</i>	2,25 b	51,74 ab
<i>Pterocarpus rohrii</i>	4,16 ab	55,67 a

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 4. Valores médios de N mic sob espécies leguminosas nas profundidades de 0 a 5 e 5 a 10 cm no outono e primavera. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.

Espécie	N mic (mg N _{mic} kg ⁻¹ de solo)			
	Outono		Primavera	
	0-5	5-10	0-5	5-10
<i>Andira anthelmia</i>	7,57 a	3,74 b	49,59 a	42,63 a
<i>Inga edulis</i>	6,18 a	4,40 a	46,69 a	48,41 a
<i>Inga striata</i>	2,48 a	2,02 a	51,88 a	51,60 a
<i>Pterocarpus rohrii</i>	4,04 a	2,28 a	58,46 a	52,88 a

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Foram identificadas interações entre os fatores estação e espécie, onde nota-se ausência de diferenças entre espécies no outono, mas observa-se valores superiores de N_{mic} no solos sob *P. rohrii* na primavera (Tabela 5).

Tabela 5. Interação dos fatores estação x espécie - N mic do Solo sob espécies leguminosas. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.

Espécie	N mic (mg N _{mic} kg ⁻¹ de solo)	
	Outono	Primavera
<i>Andira anthelmia</i>	5,66 bA	46,11 aB
<i>Inga edulis</i>	5,29 bA	47,55 aB
<i>Inga striata</i>	2,25 bA	51,74 aAB
<i>Pterocarpus rohrii</i>	4,16 bA	55,67 aA

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Comparações nas colunas são representadas por letras maiúsculas; e nas linhas por letras minúsculas.

Em estudos sob plantios de eucalipto, Gama-Rodrigues et al. (2005), atribuem ao aumento da precipitação pluviométrica o aumento nos teores de N microbiano, nas estações mais chuvosas, o que poderia ser interpretado como resultante da maior taxa de decomposição da matéria orgânica, reduzindo, temporariamente, o N microbiano e aumentando do N mineral.

Os maiores valores de nitrogênio da biomassa microbiana na primavera indicam que, neste período, o reservatório de N fica maior; e menores serão as perdas de N para o sistema e maior será a fração lábil da matéria orgânica prontamente disponível no solo. Menores valores no outono refletem a menor população microbiana, desta forma, com a morte de parte da BM, o N incorporado em suas células foi liberado no solo e mineralizado pelo restante da biomassa, liberando os nutrientes imobilizados.

A imobilização, por ser um processo temporário, torna a biomassa microbiana uma importante fração do N potencialmente mineralizável. Dessa forma, quanto maiores os teores de N da biomassa microbiana, mais rápida será sua reciclagem (Cochran et al., 1988; Anderson, 2003).

A relação C:N microbiana pode ser usada como índice para expressar a eficiência da biomassa em imobilizar C ou N, refletindo a qualidade da matéria orgânica do solo (Gama-Rodrigues & Gama-Rodrigues, 2008). Conforme Smith & Paul (1990) o valor de referência da relação C:N microbiano em floresta seria de 5. Portanto, os valores médios encontrados neste estudo, entre 6 e 7, na primavera (Figura 6), superam o esperado para esse tipo de ecossistema. Loureiro (2012) ao avaliar solos de uma toposequência sob vegetação natural, em relevo semelhante ao do presente estudo, encontrou valores médios

de C:N microbiano de 6,7 na estação chuvosa e 1,3 em época de seca, creditando as diferenças entre esses valores à precipitação pluviométrica, que promoveria maior acúmulo de CBM.

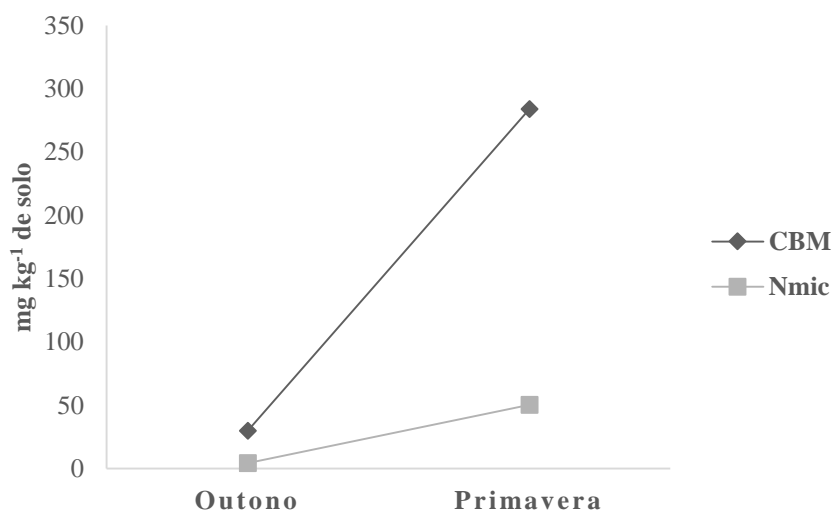


Figura 6. Valores médios de Carbono e Nitrogênio da Biomassa Microbiana no outono e primavera, sob espécies leguminosas. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.

3.3 Respiração Basal do Solo

Após 10 dias de incubação, a Respiração Basal do Solo não apresentou-se distinta sob as espécies em estudo (Tabela 6), encontrando-se valores entre 0,95 e 1,16 mg de C-CO₂ kg⁻¹ solo hora⁻¹ no outono e 0,83 e 1,10 mg de C-CO₂ kg⁻¹ solo hora⁻¹ na primavera. Valores semelhantes foram encontrados por Borges et al. (2009) avaliando a atividade microbiana em solos sob floresta semidecídua do Mato Grosso do Sul.

Tabela 6. Valores médios de Respiração Basal do Solo sob espécies leguminosas no outono e primavera. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.

Espécie	RBS (mg de C-CO ₂ kg ⁻¹ solo hora ⁻¹)	
	Outono	Primavera
<i>Andira anthelmia</i>	1,00 a	0,90 a
<i>Inga edulis</i>	0,98 a	1,10 a
<i>Inga striata</i>	0,95 a	1,05 a
<i>Pterocarpus rohrii</i>	1,16 a	0,83 a

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Ao avaliar o comportamento do processo de respiração do solo, é possível observar diferenças na atividade microbiana entre as profundidades, onde a camada de 0 a 5 cm superou as taxas de CO₂ liberados, comparativamente à camada de 5 a 10 cm. Estes resultados podem ser verificados tanto no outono quanto na primavera, considerando apenas as profundidades (Tabela 7). A quantidade de CO₂ liberada pela respiração dos microrganismos é um dos métodos mais tradicionais e mais utilizados para avaliar a atividade metabólica da população microbiana do solo (Zibilske, 1994).

Segundo Insam e Domsch (1988), à medida que uma determinada biomassa microbiana se torna mais eficiente, menos carbono é perdido como CO₂ pela respiração e uma fração significativamente de carbono é incorporada à BM. Assim, estes resultados sugerem que estas áreas apresentam uma biomassa microbiana eficiente.

Chaer e Tótola (2007), em estudo sobre impacto do manejo de resíduos em plantios de eucalipto, encontraram, sob área de vegetação natural de mata secundária valores de liberação de CO₂ de 1,221 e 0,696 mg de C-CO₂ kg⁻¹ solo hora⁻¹ nas profundidades de 0 a 5 e 5 a 20 cm, respectivamente.

Ao aplicar o teste de interação, através de análise fatorial, encontrou-se efeito de interação entre os fatores profundidade e espécie, no outono e primavera. No entanto, avaliando as médias, estas não apresenta diferenças significativas (Tabela 7).

O desenvolvimento e atividade dos grupos de microrganismos podem sofrer alterações em função das condições ambientais. Dentre estas variáveis destacam-se a precipitação e temperatura como maiores interferentes sobre a microbiota (Gama-Rodrigues, 1999).

Tabela 7. Interação dos fatores profundidade x espécie - Respiração Basal do Solo sob espécies leguminosas nas profundidades de 0 a 5 e 5 a 10 cm no outono e primavera Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.

Espécie	RBS (mg de C-CO ₂ kg ⁻¹ solo hora ⁻¹)			
	Outono		Primavera	
	0-5	5-10	0-5	5-10
<i>Andira anthelmia</i>	1,18 aA	0,64 bA	1,54 aA	0,83 bA
<i>Inga edulis</i>	1,16 aA	0,89 bA	1,31 aA	0,80 bA
<i>Inga striata</i>	1,14 aA	0,81 bA	1,29 aA	0,76 bA
<i>Pterocarpus rohrii</i>	1,36 aA	0,59 bA	1,07 aA	0,99 bA

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Comparações nas colunas são representadas por letras maiúsculas; e nas linhas por letras minúsculas.

Considerando que na primavera a precipitação foi maior, comparativamente ao outono (Simepar, 2015), pode-se atribuir as menores taxas de respiração do solo neste período à este fator. Gama-Rodrigues et al. (2005), estudando atributos microbiológicos em plantações de eucalipto observou que em períodos finais de seca a liberação de CO₂ pela atividade microbiana era maior em relação aos períodos iniciais de chuva. O mesmo comportamento foi observado por Silva et al. (2016), em que maior taxa de respiração ocorreu nos períodos mais secos.

Quando comparados os solos sob as diferentes espécies nas diferentes profundidades, observou-se que apenas os valores médios sob *Inga edulis* não apresentaram diferença relevante entre elas (Figura 7). Enquanto, quando as estações são consideradas, todas as espécies apresentaram maior respiração no outono (Figura 8).

Facci (2008), avaliando o efeito da estação e profundidade em mata nativa, também obteve diferenças entre as profundidades de coleta, onde as taxas de liberação de CO₂ decresceram de acordo com a profundidade; no entanto, quanto às estações, não foi possível verificar essa diferenciação, assim como Peña et al. (2005) ao utilizar a respiração do solo como indicador microbiológico em áreas de recuperação em floresta no litoral paranaense, em estações climáticas semelhantes às deste estudo.

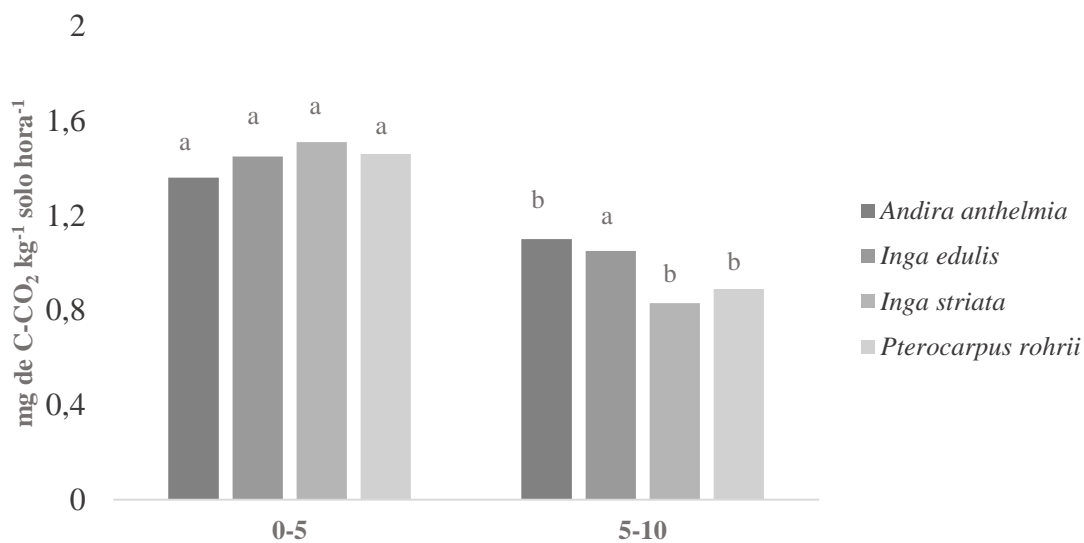


Figura 7. Valores médios de Respiração Basal do Solo nas diferentes profundidades. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Comparações entre estações.

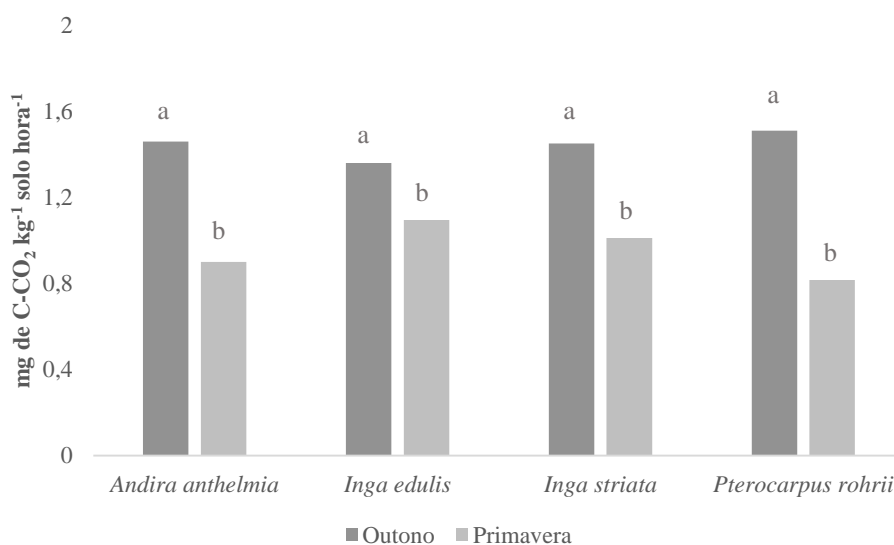


Figura 8. Valores médios de Respiração Basal do Solo no outono e primavera. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Comparações entre estações.

A medida da respiração do solo é bastante variável e dependente, principalmente, da disponibilidade do substrato, umidade e temperatura. Os microrganismos respondem rapidamente a mudanças nas condições do solo após longos períodos de baixa atividade. Por exemplo, poucos minutos em seguida ao reumedecimento do solo ocorre aumento na respiração e mineralização do C e do N da matéria orgânica do solo (Brookes, 1995). Desta forma, pode-se creditar as maiores taxas de respiração na camada mais superficial por esta apresentar maior sensibilidade às alterações externas ao ecossistema solo.

3.4 Quociente Metabólico

A utilização do quociente metabólico (qCO_2), como indicador tem suporte na teoria de sucessão ecológica, proposta por Odum (1969) e é representada pela relação entre RBS e BMS ou CBM (Anderson & Domsch, 1985). De acordo com a teoria, o valor de qCO_2 sofre redução durante a sucessão ou aumento da maturidade do solo, podendo ser utilizada na quantificação mais clara da atividade microbiana no solo (Insam & Domsch, 1988).

Para o quociente metabólico, da mesma forma que observado para RBS, em ambas profundidades, os valores foram superiores no outono, em comparação a primavera (Tabela 8). Estes dados indicam que neste período houve maior direcionamento da energia para a manutenção da biomassa microbiana em detrimento ao crescimento populacional, de maneira que uma parte do CBM fosse pedida como CO_2 .

Conforme Gama-Rodrigues (1999) os valores mais baixos, encontrados na primavera, demonstram melhores condições ao desenvolvimento da biomassa microbiana, pois esta incorporou quantidades mais elevadas de carbono orgânico, reduzindo as perdas de CO_2 para a atmosfera.

Ao avaliar as profundidades, observa-se uma tendência de maiores valores de CBM e RBS na profundidade de 0-5 cm, refletindo nos valores reduzidos de qCO_2 nesta camada, com exceção das amostras sob *I. striata*. Cardoso et al. (2009), avaliando qualidade do solo sob floresta nativa do Pantanal, encontrou a mesma tendência de maiores valores de CBM e RBS, bem como, menores valores de qCO_2 , na camada mais superficial do solo, onde a população microbiana demonstra-se ser mais ativa nos processos de decomposição e mineralização de nutrientes.

Tabela 8. Valores médios do Quociente Metabólico sob espécies leguminosas no outono e primavera, na profundidade de 0 a 5 e 5 a 10 cm. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.

Espécie	<i>qCO2</i>			
	0-5		5-10	
	Outono	Primavera	Outono	Primavera
<i>Andira anthelmia</i>	0,032 a	0,005 b	0,044 a	0,005 b
<i>Inga edulis</i>	0,032 a	0,005 b	0,035 a	0,004 b
<i>Inga striata</i>	0,057 a	0,004 b	0,033 a	0,003 b
<i>Pterocarpus rohrii</i>	0,042 a	0,039 b	0,043 a	0,003 b

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4 CONCLUSÕES

Na primavera os valores de Carbono e Nitrogênio da biomassa microbiana apresentaram-se mais elevados, indicando que neste período a microbiota encontrava-se em estado favorável a sua manutenção.

As espécie que mostraram-se mais favoráveis ao crescimento da população microbiana foram *Inga edulis* e *Andira anthelmia*.

O metabolismo microbiano, no outono, apresentou maior dificuldade, fazendo com que o ecossistema solo perdesse C na forma de CO₂. Quando a umidade aumentou na primavera, somada as temperaturas ideais para o desenvolvimento, a comunidade microbiana retornou à atividade sem grandes perdas e maior efetividade no crescimento e manutenção.

Menores valores obtidos para $q\text{CO}_2$ na primavera refletiram a maior eficiência da biomassa microbiana em utilizar o carbono disponível para biossíntese, servindo como indicador de que, neste período, o ecossistema encontrava-se mais estável.

Assim, conclui-se que a atividade microbiológica do solo se mostrou influenciada tanto pelas condições climáticas como por algumas espécies arbóreas.

5 LITERATURA CITADA

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

ANDERSON, T.H.; DOMSCH, K.H. The metabolic quotient for CO₂ as specific activity parameter to assess the effects on environmental conditions, such pH, on the microbial biomass, of forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, v.25, p.393-295, 1993.

BORGES, C.D.; MERCANTE, F.M.; SALTON, J.C.; CARVALHO, E.M. Biomassa microbiana do solo em fitofisionomias no sul de Mato Grosso do Sul. *Ensaio e Ciência: C. Biológicas, Agrárias e da Saúde*, v. 13, p. 51-62, 2009.

BROOKES, D. C. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v. 19, p. 269-279, 1995.

CARDOSO, E.L.; SILVA, M.L.N.; MOREIRA, F.M.S.; CURI, N. Atributos biológicos indicadores da qualidade do solo em pastagem cultivada e nativa no Pantanal. *Pesq. Agropec. Bras.*, v. 44, p. 631-637, 2009.

CHAER, G.M.; TÓTOLA, M.R. Impacto do manejo de resíduos orgânicos durante a reforma plantios eucalipto sobre indicadores qualidade solo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.31, p.1381-1396, 2007.

CHENG, W.; JOHNSON, D.W. Elevated CO₂, rhizosphere processes, and soil organic matter decomposition. *Plant and Soil*, v.202, p.167-174, 1998.

COCHRAN, V.L.; HORTON, K.A.; COLE, C.V. An estimation of microbial death rate and limitations of N or C during wheat straw decomposition. *Soil Biology and Biochemistry*, v.20, p.293-298, 1988.

D'ANDRÉIA, A.F.; SILVA, M.L.N.; CURI, N.; SIQUEIRA, J.O.; CARNEIRO, M.A.C. Atributos biológicos indicadores da qualidade do solo em sistemas manejo na região do cerrado no Sul do Estado de Goiás. *R. Bras. Ci Solo*, v. 26, p. 913-923, 2002.

DE-POLLI, H.; GUERRA, J. G. M. Biomassa microbiana: Perspectiva para o seu uso e manejo do solo. In: ALVAREZ, V. H.; FONTES, L. E. F.; FONTES, E. M. P. F., (Ed.). O Solo nos grandes domínios morfoclimáticos do Brasil e o desenvolvimento sustentado. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo; Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1996. p. 551-564.

DE-POLLI, H.; GUERRA, J. G. M. Determinação do carbono da biomassa microbiana do solo: método de fumigação-extração. Seropédica: Embrapa-CNPAB, 1997. 10 p. (Embrapa- CNPAB. Documentos, 37).

DE-POLLI, H.; GUERRA, J.G.M.. Carbono, nitrogênio e fósforo na biomassa microbiana do solo. In: SANTOS, G.A.; SILVA, L.S.; CANELLAS, L.P.; CAMARGO, F.A.O. (Eds). Fundamentos da matéria orgânica – Ecossistemas tropicais e subtropicais. 2.ed. Porto Alegre: Metropole, 2008. 645p.

DÍAZ-RAVIÑA, M.; ACEA, M.J. & CARBALLAS, T. Seasonal changes in microbial biomass and nutrient flush in forest soils. *Biol. Fert. Soils*, v.19, p.220-226, 1995.

DORAN, J.W. & PARKIN, T.B. Quantitative indicators of soil quality: a minimum data set. In: DORAN, J.W & JONES, A.J., eds. *Methods for assessing soil quality*. Madison: SSSA, Soil Sci. Soc. America, 1996. p.25-37. (SSSA Special Publication, 49)

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de solo. *Manual de Métodos de análise de Solo*. 2. ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 1997.

FALL, D.; DIOUF, D.; ZOUBEIROU, A. M.; BAKHOUM, N.; FAYE, A.; SALL, S. N. Effect of distance and depth on microbial biomass and mineral nitrogen content under *Acacia Senegal* (L.) Willd. Trees. *Journal of Environmental Management*, v. 95, p. 260-264, 2012.

FEIGL, B.J.; SPARLING, G.P.; ROSS, D.J. et al. Soil microbial biomass in Amazonian soils: evaluation of methods and estimates of pool sizes. *Soil Bio. & Bioch.*, v. 27, p. 1467-1472, 1998.

FERREIRA, A.S.; CAMARGO, F.A.O.; VIDOR, C. Utilização de microondas para avaliação da biomassa microbiana do solo. *R. Bras. Ci.Solo*, Viçosa, v. 23, p. 991-996, 1999.

FRIGHETTO, R.T.S. XVII. Análise da biomassa microbiana em carbono: método de fumigação extração. In: FRIGHETTO, R.T.S., VALARINI, P.J. (Coords). Indicadores biológicos e bioquímicos da qualidade do solo. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. p.157-166. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 21).

GAMA-RODRIGUES, E.F.; BARROS, N.F.; GAMA-RODRIGUES, A.C.; SANTOS, G.A. Nitrogênio, Carbono e atividade da biomassa microbiana do solo em plantações de eucalipto. *R. Bras. Ci. Solo*, v. 29, p. 893-901, 2005.

GAMA-RODRIGUES, E. F. Biomassa microbiana e ciclagem de nutrientes. In: SANTOS, G. A.; CAMARGO, F. A. (Ed). Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais. Porto Alegre: Gênese, 1999. p. 227-243.

GAMA-RODRIGUES, E.F.; GAMA-RODRIGUES, A.C. Biomassa microbiana e ciclagem de nutrientes. In: SANTOS, G.A.; SILVA, L.S.; CANELLAS, L.P.; CAMARGO, F.A.O. (Eds). Fundamentos da matéria orgânica – Ecossistemas tropicais e subtropicais. 2.ed. Porto Alegre: Metropole, 2008. 645p.

INSAM, H. Developments in soil microbiology since the mid 1960s. *Geoderma*, v. 100, n. 3, p. 389-402, 2001.

INSAM, H.; DOMSCH, K. H. Relationship between soil organic carbon and microbial biomass on chronosequences of reclamation sites. *Microbial Ecology*, v. 15, n. 4, p. 177-188, 1988.

LOUREIRO, D.C. Biomassa microbiana do solo na Amazônia, Mata Atlântica e Antártica. 97 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2012.

MARUMOTO, T.; ANDERSON, J.P.E. & DOMSCH, K.H. Mineralization of nutrients from soil microbial biomass. *Soil Biol. Biochem.*, v.14, p. 469-475, 1982.

MELE, P.M. & CARTER, M.R. Effect of climatic factors on the use of microbial biomass as an indicator of changes in soil organic matter. In: MULONGOY, K. & MERCKX, R. *Soil organic matter dynamics and sustainability of tropical agriculture*. Chichester, John Wiley, 1993. 392p.

MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. Lavras: Editora UFLA, 2002.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. 2.ed. Lavras: UFLA, 2006. 729p.

ODUM, E. P. Trends expected in stressed ecosystems. *BioScience*, Londres, v. 35, p. 419-422, 1985.

PEÑA, M.L.P.; MARQUES, R.; JAHNEL, M.C.; ANJOS, A.A. Respiração microbiana como indicador da qualidade do solo em ecossistema florestal. *Floresta*, v. 35, p. 117-126, 2005.

PIAO, H. C.; HONG, Y. T.; YUAN, Z. Y. Seasonal changes of microbial biomass carbon related to climatic factors in soil from Karst areas of southwest China. *Biology and Fertility of Soils*, Berlim, v. 30, n. 4, p. 294- 297, 2000.

ROSCOE, R.; MERCANTE, F. M.; SALTON, J. C. Dinâmica da matéria orgânica do solo em sistemas conservacionistas: modelagem matemática e métodos auxiliares. In: ROSCOE, R.; MERCANTE, F. M.; MENDES, I. C.; REIS JÚNIOR, F. B.; SANTOS, J.

C. F.; HUNGRIA, M. (eds). Biomassa microbiana do solo: fração orgânica mais ativa da matéria orgânica. Embrapa, 2006, p.163-198.

SAVIOZZI, A.; BUFALINO, P.; LEVI-MINZI, R.; RIFFALD, R. Biochemical activities in a degraded soil restored by two amendments: a laboratory study. *Biology & Fertility of Soils*, Berlin, v. 35, p. 96-101, 2002.

SILVA, C. F. PEREIRA, M.G.; MIGUEL, D.L.; FEITORA, J.C.F.; LOSS, A.; MENEZES, E.G.; SILVA, E.M.R. Carbono orgânico total, biomassa microbiana e atividade enzimática do solo de áreas agrícolas, florestais e pastagem no médio Vale do Paraíba do Sul (RJ). *Rev. Bras. Ciênc. Solo: Viçosa*, v. 36, n. 6, p. 1680-1689, 2012.

SILVA, E. E.;AZEVEDO,P.H.S.; DE-POLLI, H. Determinação da respiração basal (RBS) e quociente metabólico do solo (qCO_2). Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 4p. (Comunicado Técnico, 99)

SILVA, E. E.;AZEVEDO,P.H.S.; DE-POLLI, H. Determinação do carbono da biomassa microbiana do solo (BMS-C) Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 6p. (Comunicado Técnico, 98)

SILVA, C.M.; VASCONCELOS, S.S.; MOURÃO JÚNIOR, M.; BISPO, C.J.C.; KATO, O.R.; SILVA JUNIOR, A.C.; CASTELLANI, D.C. Variação temporal do efluxo de CO_2 do solo em sistemas agroflorestais com palma de óleo na Amazônia Oriental. *Acta Amaz.*, Manaus, v. 46, p. 1-12, 2016.

SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. Biotecnologia do solo: Fundamentos e Perspectivas. Brasília: MEC Ministério da Educação, ABEAS; Lavras: ESAL, FAEPE, 1988. 236p.

SISTEMA METEREOLÓGICO DO PARANÁ. Análise climática para o período de 01 a 15 de abril/2015 para o estado do Paraná. Disponível em: < http://www.simepar.br/site/internas/conteudo/institucional/index_noticias.shtml> Acesso em 23 out. 2015.

TÓTOLA, M. R.; CHAER, G. M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. *Tópicos Especiais em Ciências do Solo*, v. 2, n. 1, p. 196-275, 2002.

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

WHITE, C.S.; GOSZ, J.R. Factors controlling nitrogen mineralization and nitrification in forest ecosystems in New Mexico. *Biology and Fertility of Soils*, v. 5, p. 195-202, 1987.

ZIBILSKE, L. M. Carbon mineralization. In: WEAVER, R. W.; SCOTT, A.; BOTTOMLEY, P. J. (Ed.). *Methods of soil analysis: microbiological and biochemical properties*. Madison: Soil Science Society of America, 1994. p. 10-35. (Special Publication 5).

CAPÍTULO 3 – MINERALIZAÇÃO DE NITROGÊNIO EM SOLOS SOB ESPÉCIES NATIVAS LEGUMINOSAS EM ÁREAS DE REGENERAÇÃO NATURAL NA MATA ATLÂNTICA DO SUL DO BRASIL.

RESUMO

A transformação do N orgânico em mineral é uma fase significativa no ciclo do nitrogênio e uma importante fonte de N mineral para os ecossistemas. Sua dinâmica é variável em função da constituição da MOS, das condições ambientais, das características químicas do solo e da atividade microbiana. Desta forma, este estudo teve como objetivo determinar e comparar a mineralização de N e as quantidades acumuladas de N mineral, em diferentes estações do ano, por meio de ensaios de incubação anaeróbica de solos coletados sob espécies florestais nativas, da família *Fabaceae*, ocorrendo em florestas secundárias da Mata Atlântica, em Antonina, PR, Brasil. As amostras foram coletadas no outono e primavera, nas profundidades de 0 a 5 e 5 a 10 cm; a avaliação das taxas de mineralização de N foram realizadas sob condições anaeróbicas como parte de um estudo mais amplo englobando outras florestas. A primavera apresentou-se mais favorável ao processo de mineralização, por ser estação com temperaturas mais elevadas e maior precipitação pluviométrica. Quanto às profundidades avaliadas, a camada superficial apresentou maior taxa de mineralização de N em ambas estações climáticas. Os picos de mineralização na fase inicial sugerem que os microrganismos do solo consumiram inicialmente os compostos mais lábeis. Os valores de N mineral encontrados sob as espécies indicam que estas podem favorecer a presença de microrganismos atuantes no processo de mineralização, neste estudo destacou-se *Inga edulis*.

Palavras-Chave: N mineral, Biomassa microbiana do solo, Metabolismo do solo, Ciclagem de nitrogênio e Incubação anaeróbica.

1 INTRODUÇÃO

No ciclo do nitrogênio, uma das principais características é a interação entre a atividade dos organismos autotróficos e heterotróficos. O nitrogênio, assim como outros elementos essenciais, é utilizado repetidamente na circulação contínua entre etapas que envolvem esses dois grupos de organismos (Paul & Clark, 1996; Atlas & Bartha, 1998).

O potencial de mineralização dos solos, definido como a fração presente no nitrogênio orgânico suscetível à mineralização, tem estreita relação com os teores de matéria orgânica e nitrogênio total. Teoricamente, quanto maior o potencial produtivo de biomassa do ecossistema, maior será o aporte de matéria orgânica do solo, e por consequência, maior será a quantidade de N mineralizada e maior a disponibilidade de N (Stanford & Smith, 1972; Gonçalves et al., 2001). Estudos realizados por Carvalho (2011), Müller (2012), Biesek (2012), Blum (2014), Woiciechowski (2015) e Silveira (2015) buscam compreender a dinâmica de mineralização de N no solo por meio de ensaios anaeróbicos em áreas florestais.

O processo de mineralização consiste no resultado da decomposição de compostos nitrogenados orgânicos pelos microrganismos do solo, que os utilizam como fonte de carbono, nitrogênio e energia. Durante a mineralização, os seus variados componentes são transformados, em velocidades diferentes, em nitrogênio inorgânico, podendo alguns serem acumulados em função do seu elevado grau de recalcitrância e resistência ao ataque microbiano; ou ainda devido às condições edáficas e climáticas; além da própria atividade microbiana (Janssen, 1996; Camargo et al., 1997; Camargo et al., 1999; Rhoden et al., 2006).

A transformação do N orgânico em mineral é uma fase significativa no ciclo do nitrogênio, pois é um fenômeno biológico multiplicativo, representado pelo crescimento, mudanças e renovações que resultam na formação da MOS e biomassa microbiana. (Franzluebbers et al., 1994).

Em toda atividade de mineralização existe um componente de imobilização, decorrente da assimilação de nutrientes minerais responsáveis pela multiplicação, crescimento e manutenção da biomassa microbiana do solo (BMS), pois exigem quantidade elevada de N. Células bacterianas, por exemplo, contêm de 5 a 10% de N, representando uma demanda muitas vezes superior a 20 kg N ha^{-1} . Portanto, se a demanda

pela BMS for alta, a concentração de N no solo declina, e vice-versa (Schlesinger, 1997; Camargo et al., 1999; Moreira & Siqueira, 2006).

Para avaliação da mineralização de N em laboratório, os métodos de incubação aeróbia e anaeróbia de amostras de solo permitem a obtenção de valores de N mineralizado, de N potencialmente mineralizável e de taxas de mineralização de N e C bem correlacionadas com as quantidades absorvidas pelas plantas (Stanford et al., 1973; Lemos et al., 1988). Estes métodos permitem comparar sítios, embora não reflitam as flutuações naturais que ocorrem sob condições de campo.

A mineralização apresenta uma dinâmica variável em função da constituição da MOS, das condições ambientais, das características químicas do solo e da atividade microbiana, entre outros, o que justifica estudos que busquem compreender a sua dinâmica e sua relação com os outros componentes do ecossistema. Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar a mineralização de N, por meio de ensaios de incubação anaeróbica de solos coletados sob espécies florestais nativas, da família Fabaceae, em áreas de regeneração natural da Floresta Atlântica do Sul do Brasil, em diferentes estações do ano.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coletas de solo

Foram definidos dois pontos de coleta na projeção da copa das árvores, entre 1 e 2 metros do tronco. Nestes pontos, foi retirada a serapilheira depositada e com auxílio de pá cortadeira retirou-se um monólito de solo de onde foram extraídas as amostras de solo nas profundidades de 0-5 e 5-10 cm. As duas amostras de solo, de cada camada, foram agrupadas em uma única amostra composta por profundidade e por árvore.

Os solos foram coletados sob 12 indivíduos de *Andira anthelmia*, 12 indivíduos de *Pterocarpus rohrii*, 10 indivíduos de *Inga edulis* e oito indivíduos de *Inga striata*, em duas profundidades, totalizando 84 amostras.

2.2 Ensaio de mineralização de nitrogênio orgânico do solo

A avaliação das taxas de mineralização de N sob condições anaeróbicas foi realizada pelo método descrito por Waring & Bremner (1964). A coleta e preparo das amostras para o ensaio de mineralização foram uma adaptação do procedimento realizado por Jussy (1998). As amostras compostas de solo, ainda a campo, foram peneiradas em malha 4 mm. Com auxílio de um cachimbo metálico (10 cm^{-3}), retiraram-se duas subamostras, uma para o ensaio de mineralização e outra para determinação da umidade de campo. A amostra para mineralização foi colocada em tubo de centrífuga contendo 30 mL de solução extratora de KCl 2 mol L^{-1} . Ao final das coletas, as amostras foram encaminhadas ao laboratório.

Após 24 horas das coletas no campo, realizou-se a extração das alíquotas, posteriormente à agitação das amostras por 45 minutos e centrifugação por 10 minutos a uma velocidade de 2000 rpm. As amostras foram então filtradas com filtro de filtração rápida, previamente preparados com 1 lavagem com 20 mL de KCl 2 mol L^{-1} e 3 lavagens consecutivas de 20 mL de H_2O deionizada, para eliminar resíduos de amônio que pudessem contaminar as amostras. A extração inicial foi denominada de ponto zero. Consecutivamente iniciou-se o processo de incubação anaeróbica das amostras, conforme metodologia adaptada de Gonçalves et al. (2001) (Figura 1).



Figura 1. Coleta das amostras de solo (A), retirada das camadas de 0-5 e 5-10 cm do monólito (B), peneiramento (C) adição da amostra à solução extratora (D), extração da solução de KCL 2 mol L^{-1} (E) e incubação das amostras na temperatura de 30°C (F).

Em cada tubo, foram adicionados 30 mL de solução nutritiva contendo Na_3PO_4 ($0,005 \text{ mol L}^{-1}$), MgSO_4 ($0,002 \text{ mol L}^{-1}$) e CaCl_2 ($0,005 \text{ mol L}^{-1}$). Procedeu-se então à agitação manual dos tubos para dispersão do solo, sendo estes, em seguida, acondicionados em incubadora, onde permaneceram a uma temperatura de 30°C . Passados 14 dias de incubação, realizou-se a primeira extração, e assim prosseguiram-se as demais extrações em intervalos de 14 dias, totalizando-se seis extrações e 70 dias de incubação. Previamente a cada nova extração, a solução nutritiva era retirada, após centrifugação dos frascos; em seguida eram adicionados 30 mL da solução de KCl 2 mol L^{-1} . Após extração, era adicionada nova solução nutritiva aos tubos, com as especificações acima descritas, para novo período de incubação.

A determinação do N mineral (N-NH_4^+ e N-NO_3^-) foi feita na solução sobrenadante filtrada. Para determinação do NH_4^+ foi utilizada metodologia baseada no método de determinação do amônio em extrato aquoso, descrito em Apha (2005) e para as leituras de nitrato utilizou-se o método de determinação por UV a 210 nm, com redução química do nitrato utilizando-se zinco metálico, adaptado de Heinzmann et al. (1988).

Para a determinação de amônio, foi diluído 1 mL do extrato em 0,2 mL de solução alcoólica de fenol, 0,2 mL de solução de nitroprussiato sódico, 0,5 mL de solução oxidante e foi completado o volume até 5 mL com água deionizada. Aguardou-se 1 hora para o desenvolvimento da cor (Figura 2) antes de submeter as amostras à leitura no espectrofotômetro Shimadzu UV Mini 1240, em comprimento de onda de 640 nm. Para a preparação das amostras para leitura de nitrato, diluiu-se 1 mL do extrato em 0,2 mL de H_2SO_4 em um frasco de 10 mL e completou-se com água deionizada para completar volume de 5 mL. A leitura foi feita a 210 nm em espectrofotômetro Shimadzu UV Mini 1240. Em duplicata de cada amostra foram adicionados 0,1 g de zinco metálico para a redução do nitrato. Após 24 horas de reação, a leitura foi realizada na duplicata. A diferença dos valores de leitura nas amostras, com e sem zinco metálico, expressa o teor de nitrato na solução extratora.

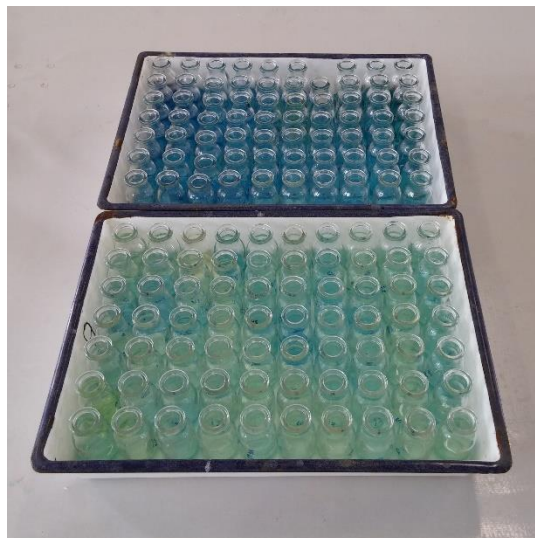


Figura 2. Extratos diluídos e adicionados soluções para leitura de amônio no espectrofotômetro.

2.3 Análise química dos solos

Para a realização desta análise, as amostras foram secas em estufa, à temperatura de 60°C, seguindo os procedimentos conforme a metodologia descrita por Embrapa (1997). Para a determinação do C utilizou-se o dicromato de sódio mais ácido sulfúrico; para o K, P e Na o extrator Mehlich I; para os elementos Ca, Mg e Al o extrator KCl 1N; o cloreto de cálcio para determinar o pH em CaCl₂ (0,01 molar). Al, Ca e Mg foram lidos em absorção atômica, K e Na em fotômetro de chama, e P por colorimetria em espectrofotômetro UV/VIS. Os micronutrientes, Cu, Fe, Mn e Zn, foram extraídos com HCl 0,1 mol L⁻¹ e determinados por absorção atômica.

2.4 Análises estatísticas

Foi adotado o delineamento inteiramente casualizado, sendo os tratamentos representados pelas espécies em estudo e as repetições pelo número de indivíduos sob os quais foram realizadas as coletas de solo. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). As diferenças entre as médias foram asseguradas pelo teste de Tukey (5% de probabilidade).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Mineralização de nitrogênio

As taxas de mineralização do outono mostram que, com exceção da última extração, as amostras de solo sob *I. edulis* apresentaram maiores valores de N mineralizado, seguidas de *I. striata*, *A. anthelmia* e *P. rohrii*. A mesma espécie apresentou maior pico de mineralização bem como maior quantidade de N acumulado ao final de 70 dias de incubação. Considerando o processo de mineralização referente à primavera, solos sob *I. edulis* superaram as outras espécies, da mesma forma que no outono, porém, desta vez, solos sob *P. rohrii* superaram as amostras sob *A. anthelmia* a partir dos 14 dias de incubação bem como nos valores de mineralização acumulada (Tabela 2 e 3).

Tabela 2. Valores médios de N mineralizado, no outono, sob diferentes espécies florestais. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.

Espécies	Dias de incubação					
	0	14	28	42	56	70
	N (mg kg ⁻¹ solo)					
<i>A. anthelmia</i>	5,05 ab	26,26 b	7,68 b	3,26 b	2,01 b	1,54 bc
<i>Inga edulis</i>	5,37 a	33,42 a	12,46 a	5,07 a	2,70 a	1,86 ab
<i>Inga striata</i>	4,86 ab	29,23 ab	11,36 a	4,13 ab	2,73 a	2,05 a
<i>Pterocarpus rohrii</i>	4,01 b	26,38 a	8,05 b	3,47 b	1,86 b	1,29 c

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 3. Valores médios de N mineralizado, na primavera, sob diferentes espécies florestais. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.

Espécies	Dias de incubação					
	0	14	28	42	56	70
	N (mg kg ⁻¹ solo)					
<i>A. anthelmia</i>	4,51 a	32,41 b	10,64 c	2,75 b	1,95 b	0,55 b
<i>Inga edulis</i>	4,53 a	43,07 a	16,44 a	4,64 a	3,23 a	1,31 a
<i>Inga striata</i>	3,49 a	37,60 ab	14,31 ab	4,64 b	3,32 a	1,13 a
<i>Pterocarpus rohrii</i>	3,79 a	32,78 b	12,81 bc	3,38 ab	2,34 b	1,04 ab

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Ao analisar os resultados em função das profundidades avaliadas, observa-se que a camada superficial apresentou maior taxa de mineralização de N em ambas estações, porém, mais acentuada no outono. (Tabela 4). Estes valores indicam maior atividade da microbiota que faz uso do N orgânico nesta porção do solo, pois a grande quantidade de raízes nessa camada e as modificações químicas e físicas proporcionadas por elas, criam um ecossistema muito especializado, onde a população microbiana é favorecida, sendo centenas de vezes superior à população do solo adjacente (Siqueira & Franco, 1988).

Woiciechowski (2015) ao estudar a mineralização de N em florestas secundárias encontrou taxas de mineralização semelhantes a este estudo, com valores médios, após duas semanas de incubação anaeróbia, de 40,75 mg kg⁻¹ solo no inverno. Müller (2012), utilizando o mesmo método para avaliar a mineralização sob a leguminosa *Senna multijuga* em cambissolo, identificou acentuada redução na mineralização após as três semanas iniciais de incubação, concluindo que durante a incubação há uma rápida liberação inicial de N, seguida de uma diminuição gradativa.

Tabela 4. Valores médios de N mineralizado nas profundidades de 0 a 5 e 5 a 10 cm, no outono e primavera, sob essências florestais leguminosas da Mata Atlântica. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.

Estação	Profundidades	Dias de incubação					
		0	14	28	42	56	70
		N (mg kg ⁻¹ solo)					
Outono	0-5 cm	5,52 a	33,44 a	11,01 a	4,61 a	2,48 a	1,84 a
	5-10 cm	4,13 b	24,20 b	8,77 b	3,36 b	2,18 a	1,53 b
Primavera	0-5 cm	4,33 a	39,89 a	14,54 a	4,04 a	2,81 a	1,03 a
	5-10 cm	3,83 a	33,04 b	12,55 b	3,66 a	2,62 a	0,99 a

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Em todas as áreas de estudo, a transformação em N mineral foi maior durante o período inicial, entre os 14 e 28 dias de incubação, com acentuado decréscimo a partir dos 42 dias. Estes dados representam a velocidade da decomposição dos compostos mais lábeis da matéria orgânica do solo pelos microrganismos, provenientes, possivelmente, da reciclagem da biomassa microbiana (Mengel, 1996).

Avaliando apenas as estações, considerando as médias de N mineralizados sob todas as espécies referência e profundidades, a primavera demonstrou ser um período favorável ao processo de mineralização (Figura 3), corroborando com dados de Blum (2014), ao avaliar mineralização de N sob plantios florestais.

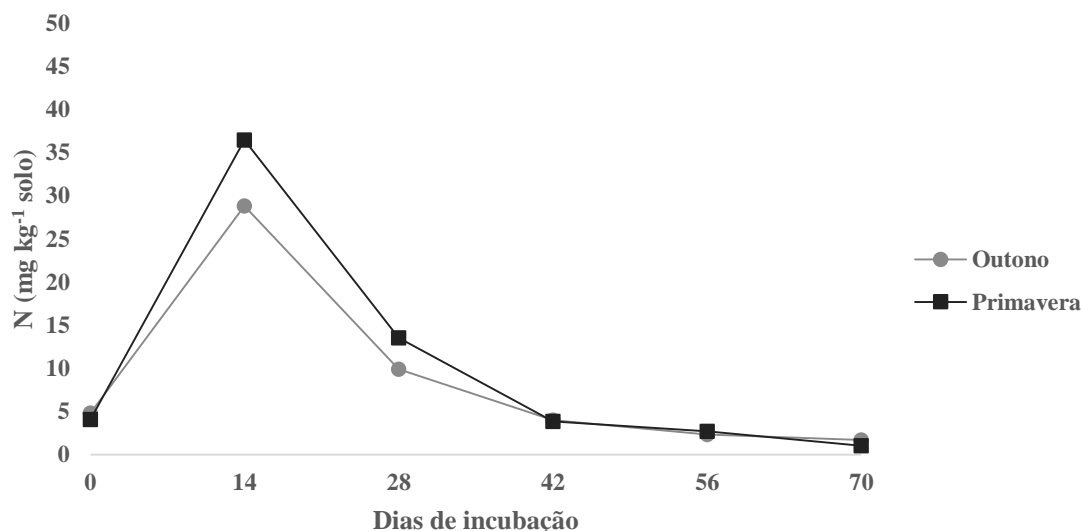


Figura 3. Valores médios de N mineralizado em estações distintas indiferentemente da profundidade. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.

A quantidade de N mineral acumulado, aos 70 dias de incubação, no outono, nas profundidades de 0 a 5 e 5 a 10 cm, foram respectivamente: sob *I. edulis* da ordem de 70 e 50 mg N kg solo⁻¹; sob *I. striata* de 70 e 60 mg N kg solo⁻¹; sob *A. anthelmia* e *P. rohri* de 50 e 40 mg N kg solo⁻¹ (Figuras 4 e 5). Enquanto na primavera, nas mesmas profundidades, os valores de N mineral acumulado apresentam-se mais elevados, onde, sob *I. edulis* os valores encontravam-se na ordem de 80 e 65 mg N kg solo⁻¹; sob *I. striata* de 60 e 50 mg N kg solo⁻¹; sob *A. anthelmia* de 55 e 50 mg N kg solo⁻¹ e *P. rohri* de 60 e 50 mg N kg solo⁻¹ (Figura 6 e 7). Em avaliações de mineralização de N sob floresta de araucárias, Biesek (2012) obteve maiores valores acumulados de na camada superficial do solo, com médias de 61,76 mg N kg solo⁻¹ e 46,23 mg N kg solo⁻¹ nas camadas de 0-5 e 5 a 10 cm.

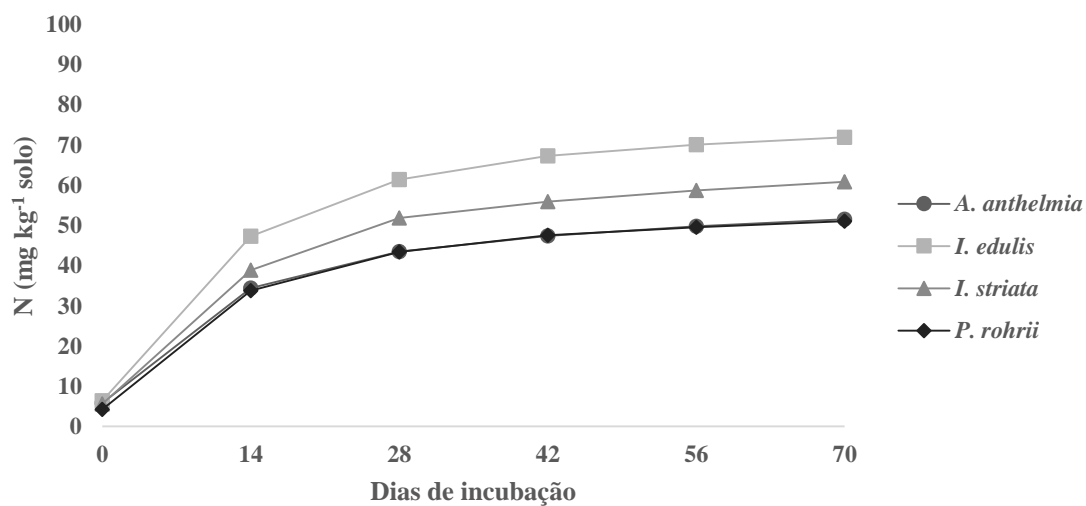


Figura 4. Valores médios de N mineral acumulado sob diferentes espécies leguminosas no outono na profundidade de 0 a 5 cm. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.

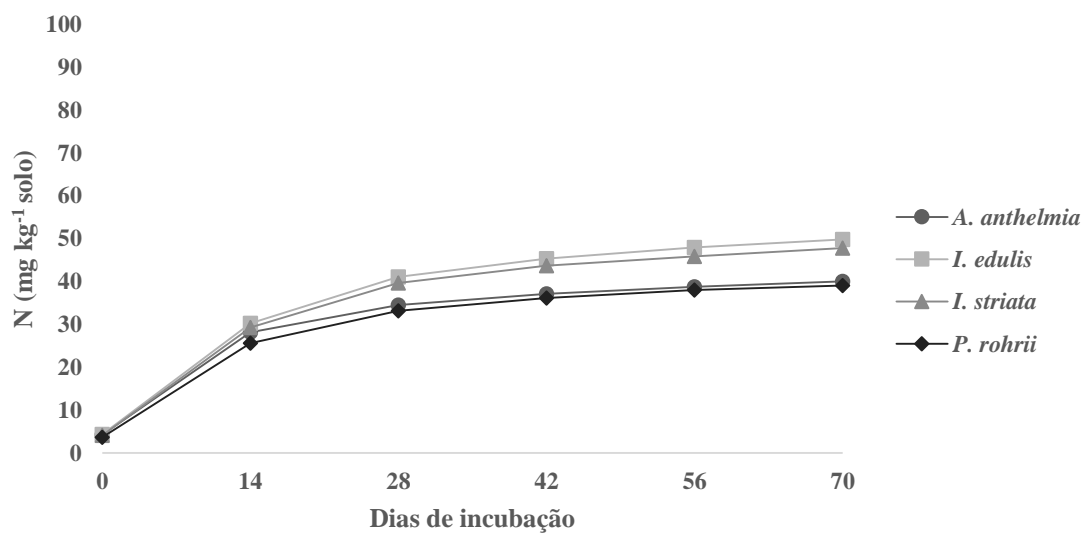


Figura 5. Valores médios de N mineral acumulado sob diferentes espécies leguminosas no outono na profundidade de 5 a 10 cm. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.

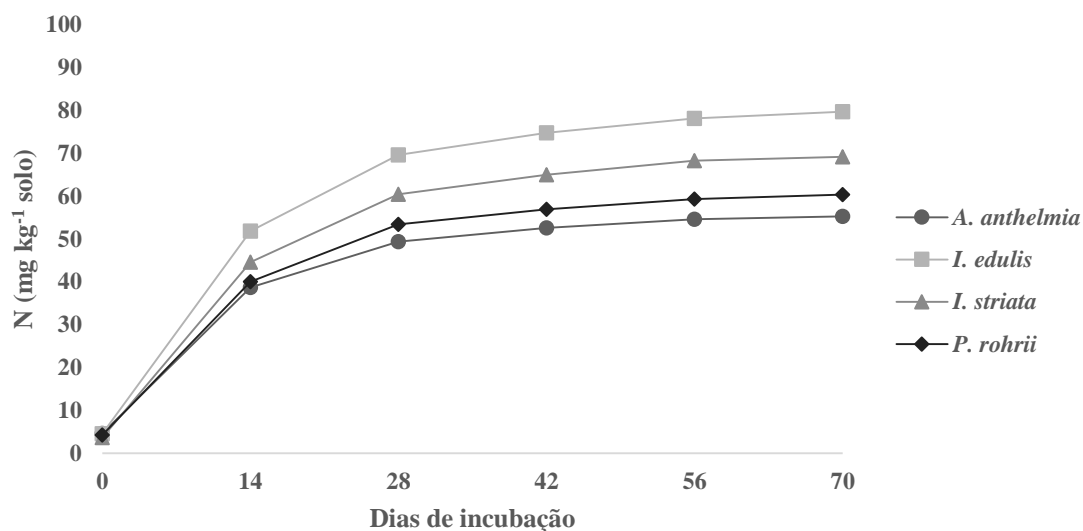


Figura 6. Valores médios de N mineral acumulado sob diferentes espécies leguminosas na primavera na profundidade de 0 a 5 cm. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.

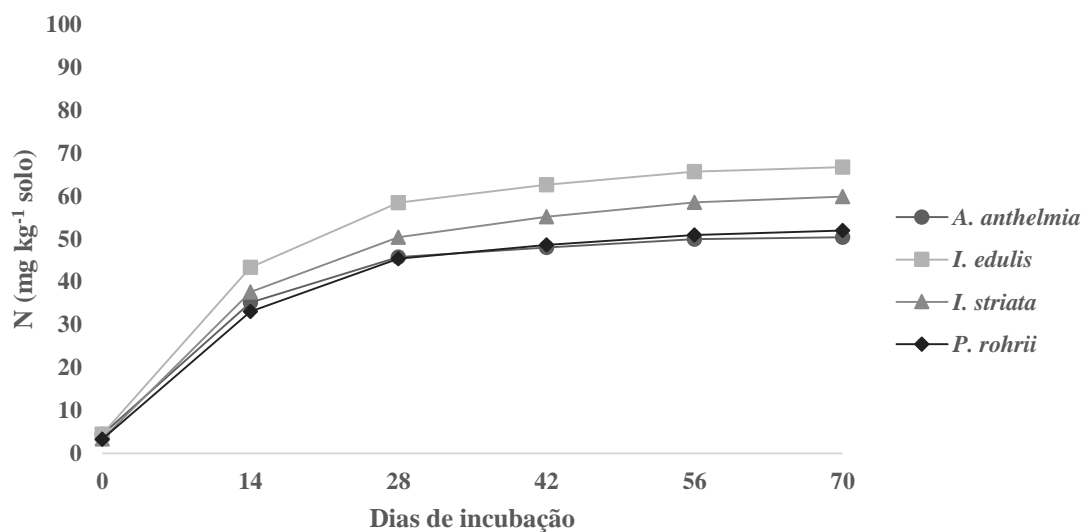


Figura 7. Valores médios de N mineral acumulado sob diferentes espécies leguminosas na primavera na profundidade de 5 a 10 cm. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.

Os dados de mineralização acumulada, seguem a mesma tendência de maiores valores sob *I. edulis* em todos os tratamentos, ou seja, profundidade e estação. Os maiores valores de N mineral disponibilizados ocorreram no intervalo do 14º e do 28º dia de incubação. A mineralização acumulada apresentou relação exponencial com o período de

incubação, sendo possível observar que cerca de 65% do N mineralizado foi obtido nos primeiros 14 dias, em todas as situações avaliadas. Ao final do tempo de incubação foi possível observar menores acréscimos na quantidade de N mineral, com valores mais estáveis. Resultados semelhantes foram encontrados por Barreto et al. (2010), em estudo sob plantações de eucalipto, com valores de N mineral maiores nas primeiras semanas de incubação.

No período de avaliação, as temperaturas foram semelhantes, em média 27°C, enquanto a pluviosidade foi mais elevada na primavera, com volume médio acumulado de chuva de 90 mm contra 15 mm no outono (Simepar, 2015). De acordo com Pulito (2009), as temperaturas médias mais elevadas e os maiores índices pluviométricos influenciam o crescimento da população microbiana e, por sua vez, a taxa de mineralização do nitrogênio. Desta forma pode-se atribuir as diferenças nos valores médio acumulados de N mineral à diferença de umidade do solo, que, somada a temperatura considerada ótima para o desenvolvimento microbiano, favoreceu o processo de decomposição e, conseqüentemente, a mineralização de N na primavera.

Em estudos da dinâmica de mineralização de N em áreas de plantios florestais e floresta secundária (Blum, 2014; Silveira, 2015), assim como neste estudo, também apresentaram relação com a pluviosidade e temperatura, onde maiores valores de N mineral foram observados em períodos quentes e chuvosos. Segundo Orians et al. (1996) a alternância de ciclos de seca e chuva e as flutuações na umidade induzem oscilações na população de microrganismos, resultando em pulsos de liberação de nutrientes.

4 CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho mostram picos de mineralização na fase inicial do processo de incubação, sugerindo que os microrganismos do solo consumiram inicialmente os compostos mais lábeis, enquanto os valores decrescentes e estáveis após estes picos indicam a redução destes compostos e a utilização, pela microbiota, dos compostos mais recalcitrantes da MOS.

Pelas condições mais favoráveis de umidade e temperatura, o processo de mineralização foi beneficiado na primavera, época em que estes parâmetros encontravam-se mais elevados.

A camada mais superficial do solo também favoreceu a mineralização do N, salientando a importância desta camada mais orgânica no funcionamento biogeoquímico em áreas de Mata Atlântica.

Os valores de N mineral encontrados sob as espécies indicam que estas podem favorecer a presença de microrganismos atuantes no processo de mineralização; e neste estudo o destaque ficou por conta da espécie *Inga edulis*, em cujo solo foram observadas as maiores taxas de mineralização.

5 LITERATURA CITADA

APHA, A. E. G.; AWWA, A. D. E.; WEF, L. S. C. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washington D. C.; American Public Health Association, 1995.

ATLAS, R.M.; BARTHA, R. Microbial ecology – fundamentals and applications. 4.ed. New York: Addison Wesley Longman Inc. 1988. 694p.

BARRETO, P.A.B.; GAMA-RODRIGUES, E.F.; GAMA-RODRIGUES, A.C.; NAIRAM, F.; ALVES, B.J.R.; FONSECA, S. Mineralização de nitrogênio e Carbono em solos sob plantações de eucalipto, em uma sequência de idades. R. Bras. Ci. Solo, v.34, p. 735-745, 2010.

BIESEK, M.F. Indicadores químicos e microbiológicos da qualidade do solo em agrossistemas e sistemas nativos na região dos Campos Gerais, castro, PR. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

BLUM, H. Caracterização biogeoquímica da serapilheira e da matéria orgânica do solo sob plantios com diferentes espécies florestais em Rio Negro-PR. 124 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

BORGO, M. Floresta Atlântica do litoral norte do Paraná, Brasil: aspectos florísticos, estruturais e estoque de biomassa ao longo do processo sucessional. 165 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

CAMARGO, F.A.O.; GIANELLO, M.J.T.; VIDOR, C. Nitrogênio orgânico no solo. *In*: SANTOS, G.A.; CAMARGO, F.A.O. (Eds) Fundamentos da matéria orgânica – Ecossistemas tropicais e subtropicais. Porto Alegre: Genesis, 1999, 508p.

CAMARGO, F.A.O.; GIANELLO,C.; VIDOR, C. Potencial de mineralização de nitrogênio orgânico em solos o Rio Grande do Sul. R. Bras. Ci. Solo, v. 22, p. 575-580, 1997.

CARVALHO, D.S. Características da serapilheira e do solo bos florestas coníferas e folhosas em Rio Negro, PR. 39 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO – CQFS RS/SC. Manual de adubação e de calagem para os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2004. 400p.

COSTA, W.A.J.M.D.; SANGAKKARA, U.R. Agronomic regeneration of soil fertility in tropical Asian smallholder uplands for sustainable food production. *Journal of Agricultural Science*, v.144, p.111-133, 2006.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de solo. Manual de Métodos de análise de Solo. 2. ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 1997.

FRANZLUEBBERS, A.J., HONS, F.M., ZUBERER, D.A. Seasonal changes in soil microbial biomass and mineralizable C and N in wheat management systems. *Soil Biol. Biochem*, v.26, p. 1469– 1475, 1994.

GONÇALVES, J.L.M; MENDES, K.C.F.S.; SASAKI, C.M. Mineralização de nitrogênio em ecossistemas florestais naturais e implantados do estado de São Paulo. *R. Bras. Ci. Solo*, v. 25, p. 601-616, 2001.

HEINZMANN, F.X.; MIYAZAVA, M. & PAVAN, M.A. Determinação de nitrato por espectrofotometria de absorção ultravioleta. *R. Bras. Ci. Solo*, 8: 159-163, 1984.

JANSSEN, B.H. Nitrogen mineralization in relation to C:N ratio and decomposability of organic materials. *Plant Soil*, The Hague, v. 181, p. 39-45, 1996.

JUSSY, J-H. Minéralisation de l'azote, nitrification et prélèvement racinaire dans différents écosystèmes forestiers sur sol acide. Effet de l'essence, du stade de

développement du peuplement et de l'usage ancien des sols. 156 f. (Tese de doutorado), Nancy, Université Henri Poincaré, 1998.

LEMOS, E.E.P.; SALCEDO, I.H. & SAMPAIO, E.V.S.B. Comparação entre o N mineralizado através de incubações com e sem percolação e o N absorvido pelo milheto em solo podzólico vermelho-amarelo. R. Bras. Ci. Solo, v.12, p. 127-130, 1988.

MENGEL, K. Turnover of organic nitrogen in soils and its availability to crops. Plant Soil, The Hague, v.181, p. 83-93, 1996.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e Bioquímica do Solo. 2.ed. Lavras: UFLA, 2006. 729p.

MÜLLER, F.C. Parâmetros químicos e microbiológicos do solo em áreas de restauração florestal na Reserva Natural Rio Cachoeira, Antonina-PR. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

ORIAN, G.H.; DIRZO, R.; CUSHMAN, J.H. Syntesis. In: ORIAN, G.H.; DIRZO, R.; CUSHMAN, J.H. (Eds). Biodiversity and ecosystem processes in tropical forests. Berlin: Spring Verlag, 1996. p.195-220.

PAUL, E.A.; CLARK, F.E. Soil microbiology and biochemistry. New York: Academic Press, 1996. 340p.

PULITO, A.P. Resposta à fertilização nitrogenada e estoque de nitrogênio biodisponível em solos usados para plantações de Eucalyptus. 58p. Dissertação, (Mestrado em Recursos Florestais). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2009.

RHODEN, A.C.; SILVA, L.S.; CAMARGO, F.A.O.; BRITZKE, D.; BENEDETTI, E.L. Nitrogen mineralization anaerobic in paddy soil from Rio Grande do Sul state, Brazil. Ciência Rural, v.36, n.6, p.1780-1787, 2006.

SCHLESINGER, W.H. Biogeochemistry: na analysis of global chance. California: Academic Press, 1997. 588p.

SILVEIRA, F.M. Ciclagem de nutrientes em estágios sucessionais da Floresta Ombrófila Densa do Paraná. 142 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

SISTEMA METEREOLÓGICO DO PARANÁ. Análise climática para o período de 01 a 15 de abril/2015 para o estado do Paraná. Disponível em: < http://www.simepar.br/site/internas/conteudo/institucional/index_noticias.shtml> Acesso em 23 out. 2015.

SISTEMA METEREOLÓGICO DO PARANÁ. Análise climática para o período de 16 a 30 de abril/2015 para o estado do Paraná. < http://www.simepar.br/site/internas/conteudo/institucional/index_noticias.shtml> Acesso em 23 out. 2015.

SISTEMA METEREOLÓGICO DO PARANÁ. Análise climática para o período de 1 a 15 de setembro/2015 para o estado do Paraná. < http://www.simepar.br/site/internas/conteudo/institucional/index_noticias.shtml> Acesso em 23 out. 2015.

SISTEMA METEREOLÓGICO DO PARANÁ. Análise climática para o período de 16 a 30 de setembro/2015 para o estado do Paraná. < http://www.simepar.br/site/internas/conteudo/institucional/index_noticias.shtml> Acesso em 23 out. 2015.

SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. Biotecnologia do solo: Fundamentos e Perspectivas. Brasília: MEC Ministério da Educação, ABEAS; Lavras: ESAL, FAEPE, 1988. 236p.

SOCIEDADE DE PESQUISA EM VIDA SELVAGEM. Plano de manejo da Reserva Natural do Cachoiera. Volume 1, Encartes I, II e III. 2005. 310 p.

STANFORD, G.; SMITH, S.J. Nitrogen mineralization potential of soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc., Madison, v.36, p. 465-472, 1972

STANFORD, G.; FRERE, M. H.; SCHWANINGER, D. H. Temperature coefficient of soil nitrogen mineralization. *Soil Science*, Baltimore, v. 115, p. 321–323, 1973.

WARING, S. A.; BREMNER, J. M. Ammonium production in soil under waterlogged conditions as an index of nitrogen availability. *Nature*, London, v.201, p. 951-952, 1964.

CAPÍTULO 4 – DIVERSIDADE BACTERIANA DIAZOTRÓFICA DO SOLO EM ÁREAS DE REGENERAÇÃO NATURAL DA MATA ATLÂNTICA DO SUL DO BRASIL.

RESUMO

A caracterização genotípica de bactérias diazotróficas tornou-se uma ferramenta útil para o conhecimento da diversidade destes organismos e compreensão sobre como a utilização do solo pode afetar a população microbiana diazotrófica. Esta caracterização pode ser realizada a partir do isolamento e purificação de colônias bacterianas, pelo método de cultivo em laboratório através de suspensões de células diluídas serialmente e plaqueadas inicialmente em meio semi-sólido e posteriormente em meio sólido. As análises de diversidade e a comparação de comunidades de procariotos geralmente baseiam-se no grau de similaridade entre sequências de 16S rRNA, indicando origem comum de genes correspondentes. Neste estudo buscou-se caracterizar, genotipicamente, comunidades microbianas do solo presentes em áreas de regeneração natural da Mata Atlântica, em diferentes estágios sucessionais, sob espécies arbóreas capazes de realizar simbiose com microrganismos do solo. Para a cultura das bactérias foi utilizado o método de diluição seriada e inoculação nos meios LGI, NFb e JNFb. Após crescimento e purificação das colônias realizou-se amplificação e sequenciamento do 16S. As sequências obtidas foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos no NCBI. Os resultados do sequenciamento indicaram que os indivíduos amostrados pertencem aos filos *Proteobacteria* (90,4%), *Firmicutes* (4,8%) e *Actinobacteria* (4,8%). A maior diversidade de gêneros ocorreu nos solos sob *Andira anthelmia* (14 gêneros), seguidos por *Pterocarpus rohrii* e *Inga edulis*, com 9 gêneros cada. *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Pseudomonas* e *Rhizobium* foram os mais frequentes, somando 37,5% da frequência total de gêneros. Ao submeter os dados químicos do solo e espécies bacterianas a uma análise discriminante, foi possível observar a distinção das espécies florestais, com características químicas como pH, P, K, Ca e Mg agrupados ao *I. edulis*. Considerando as áreas de estudo e os parâmetros químicos, foi visível a distinção da área Pinheiro, com 200 anos e formação primária, sem grandes alterações ao longo do tempo, indicando maior estabilidade nas características metabólicas e químicas do solo, bem como na comunidade microbiana existente. Assim, foi possível concluir que a presença de indivíduos da ordem *Rhizobiales* indica que nestas áreas pode ocorrer FBN por associações simbióticas; e, como o esperado, foi possível observar que a área de floresta primária, com idade mais avançada, apresentou maior estabilidade metabólica e química do solo em relação às demais.

Palavras-Chave: Fixação Biológica de Nitrogênio, Fabaceae, 16S, PCR e Sequenciamento.

1 INTRODUÇÃO

O termo diversidade, para a biologia, é geralmente utilizado para descrever o número de organismos presentes em um habitat, normalmente atribuída à diversidade de espécies. Pode ser medida em vários níveis taxonômicos ou em termos de determinadas características genéticas ou fenotípicas (Liesack et al., 1997; Moreira & Siqueira, 2006).

O conhecimento da diversidade microbiana do solo é limitado, em parte pela dificuldade de se estudar os microrganismos do solo. Apesar do grande conhecimento sobre a diversidade de bactérias diazotróficas em solos cultiváveis, pouco se sabe sobre a ocorrência dessas bactérias em solos de florestas tropicais, principalmente em associação com leguminosas. Apenas, aproximadamente, 1% da população bacteriana do solo pode ser cultivada por normas práticas de laboratório (Jarvis et al., 1992; Kirk et al., 2004).

Estudos sobre diversidade microbiana do solo vem sendo bastante discutidos, pois técnicas moleculares têm ajudado a revelar a existência de populações de microrganismos isoladas em diferentes tipos de habitats (Tiedje et al., 2001; Papke & Ward, 2004).

Na biota do solo, a quantidade de organismos microscópicos, como bactérias, fungos e protistas, podem ultrapassar de 10 a 100 vezes, o número de espécies descritos atualmente. Grande parte das espécies desconhecidas encontra-se nas florestas tropicais, onde está presente a maior diversidade do planeta, cerca de 50% do total de espécies; contudo, pouco pesquisadas (Moreira & Siqueira, 2006).

Os microrganismos procarióticos dividem-se, taxonomicamente, nos domínios Bacteria e Archaea, abrangendo a maior parte da biota da Terra, além de representar um grande *pool* biológico e genético. Seu estudo nos permite melhor entendimento sobre as relações que existem nos ciclos naturais, bem como proporciona a busca de novos genes, vias metabólicas e seus produtos (Cowan et al., 2000; Lambais et al., 2005; Simon & Daniel, 2009).

A caracterização genotípica de bactérias diazotróficas tornou-se uma ferramenta útil para o conhecimento da diversidade destes organismos e compreensão sobre como a utilização do solo pode afetar a população microbiana diazotrófica (Woese, 1991). Esta caracterização pode ser realizada a partir do isolamento e purificação de colônias bacterianas, pelo método de cultivo em laboratório inicialmente através de suspensões de células diluídas serialmente e inoculadas em meio semi-sólido e, posteriormente, plaqueadas em meio sólido (Prosser, 2002).

Na célula bacteriana, o ribossomo é composto do RNA ribossomal (rRNA) e várias proteínas. Sua estrutura apresenta duas subunidades principais: a subunidade maior (40S) e a subunidade menor (30S). Nesta última está localizado o 16S rRNA, um fragmento de aproximadamente 1500 nucleotídeos, que gera grande quantidade de informações úteis para inferências de relações filogenéticas e evolutivas entre os organismos; e seu sequenciamento tem sido amplamente empregado em estudos de diversidade (Weisburg et al., 1991; Woese, 1991; Woodson & Leontis, 1998; Amann & Ludwig, 2000). Além disso, os RNA ribossômicos e outros genes centrais envolvidos na transferência de informações, aparentemente, não sofreram uma extensa transferência lateral, produzindo a mais coerente linha para entender e inter-relacionar os principais ramos evolutivos da árvore da vida (Ochman et al., 2000).

Os métodos moleculares, em especial aqueles que se baseiam na amplificação, clonagem e sequenciamento do 16S rRNA, tornaram-se ferramentas úteis na descoberta de novos microrganismos. Essas técnicas são conhecidas como reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento de DNA, descritos, respectivamente por Saiki et al. (1988) e Sanger et al. (1977).

As análises de diversidade e a comparação de comunidades de procariotos geralmente baseiam-se no grau de similaridade entre sequências de 16S rRNA, indicando origem comum de genes correspondentes (Nubel et al., 1999; Stach et al., 2003).

Todas as sequências de bases de genes obtidas no mundo são submetidas a bancos de dados como GenBank, podendo ser comparadas com sequências já conhecidas. Atualmente, existem 3043 gêneros e 15470 espécies com sequências conhecidas e depositadas no banco de dados do GenBank (Taxonomy, 2016).

Neste estudo, buscou-se, por meio de caracterização genotípica, verificar que espécies bacterianas encontram-se em solos sob regeneração natural na Mata Atlântica, em diferentes estágios sucessionais, sob essências florestais da família Fabaceae.

Adicionalmente, esta parte desta tese gerou a possibilidade de isolamento e manutenção em laboratório de microrganismos de origem florestal, o que possibilitará construir uma coleção microbiana; além de permitir estudos bioquímicos, morfológicos, fisiológicos e, eventualmente, possibilitar o uso desses microrganismos para fins biotecnológicos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coletas e acondicionamento das amostras

Foram definidos dois pontos de coleta na projeção da copa das árvores, entre 1 e 2 metros do tronco. Nestes pontos, foi retirada a serapilheira depositada e com auxílio de pá cortadeira retirou-se um monólito de solo de onde foram extraídas as amostras de solo na profundidades de 0-10 cm. As duas amostras de solo, de cada camada, foram agrupadas em uma única amostra composta por árvore.

Foram amostrados 32 pontos e destes formaram-se 16 amostras compostas por essência florestal. O solo sob *Andira antheimia* foi amostrado nas áreas Ferro 7, Ferro 10 e Corvo 6; sob *Inga edulis* o solo foi coletado nas áreas Corvo 6 e Pinheiro 6 e sob *Pterocarpus rohrii* nas áreas Ferro 7, Ferro 10 e Pinheiro 6, conforme mapa disposto no Capítulo 1.

2.2 Análise química dos solos

Para a realização desta análise, as amostras foram secas em estufa, à temperatura de 60°C, seguindo os procedimentos conforme a metodologia descrita por Embrapa (1997). Para a determinação do C utilizou-se o dicromato de sódio mais ácido sulfúrico; para o K, P e Na o extrator Mehlich I; para os elementos Ca, Mg e Al o extrator KCl 1N; o cloreto de cálcio para determinar o pH em CaCl₂ (0,01 molar). Al, Ca e Mg foram lidos em absorção atômica, K e Na em fotômetro de chama, e P por colorimetria em espectrofotômetro UV/VIS. Os micronutrientes, Cu, Fe, Mn e Zn, foram extraídos com HCl 0,1 mol L⁻¹ e determinados por absorção atômica.

2.3 Isolamento de bactérias diazotróficas

Para a cultura das bactérias foi utilizado o método de diluição seriada das amostras de solo. Para tal, preparou-se uma solução salina (8,5 g/L de NaCl) e adicionou-se 10g de solo na proporção 1:10. Para cada amostra de solo, preparou-se um frasco contendo 90 mL da solução para realizar diluições de 10⁻¹ a 10⁻⁷. Na sequência, diluições 10⁻³, 10⁻⁴,

10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} foram inoculadas em meios de cultura específicos para crescimento de bactérias diazotróficas. Foram eles os meios LGI, NFb e JNFb.

O meio LGI (Magalhães et al., 1983) foi preparado utilizando-se sacarose, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, Fe EDTA e vitamina para meio de cultura. O pH foi ajustado para 6,0 – 6,2 com uma solução de H_2SO_4 a 5%. Adicionou-se agar e extrato de levedura. Completou-se o volume para 1000 ml com água destilada.

Para o meio NFb (Döbereiner et al., 1999) foi utilizado ácido málico, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NaCl, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, Fe EDTA, KOH, micronutrientes para meio de cultura e vitamina para meio de cultura. O pH foi ajustado para 6,5 com solução de KOH a 1%. Adicionou-se ágar e extrato de levedura. Completou-se o volume para 1000 ml com água destilada.

O meio JNFb (Döbereiner et al., 1980) foi preparado utilizando-se ácido málico, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NaCl, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, Fe EDTA, KOH, micronutrientes para meio de cultura e vitamina para meio de cultura. O pH foi ajustado para 5,8 com solução de KOH a 1%. Adicionou-se ágar e extrato de levedura. Completou-se o volume para 1000 ml com água destilada.

Cada amostra foi inoculada nos três meios, de consistência semi-sólida, nas cinco diluições escolhidas das quais foram realizadas três repetições. Os frascos inoculados permaneceram em estufa pelo período de sete dias a temperatura de 28°C.

Para confirmação da presença e crescimento bacteriano foi avaliada a presença de película indicativa. As amostras que apresentaram a película foram separadas em grupos de acordo com a intensidade da formação da película (Figura 1).

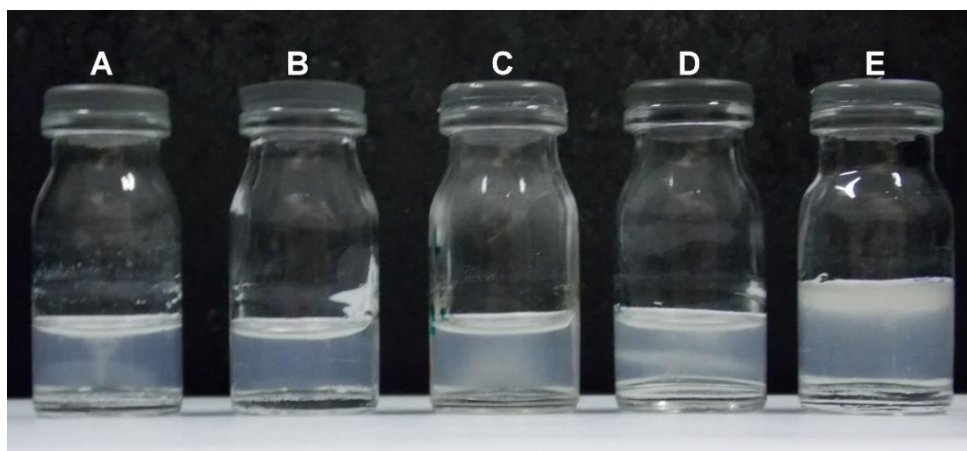


Figura 1. Frascos mostrando controle positivo (A), controle negativo (B), película em crescimento (C), formação de película (D) e película na superfície (E) (Imagem: o autor).

Com a seleção dos frascos que apresentaram películas semelhantes à figura 1, obteve-se o total de 119 amostras com indicativos de crescimento bacteriano. Posteriormente realizou-se a inoculação destas amostras em placa, respeitando-se os meios de origem em consistência sólida e mantidos em estufa à 28°C, a fim de observar o crescimento de isolados bacterianos. Após sete dias fez-se a avaliação das placas, observando o crescimento de colônias. As placas que apresentaram mais de uma forma de colônia, foram isoladas novamente; cada colônia em uma placa diferente para que não houvesse crescimento sobreposto entre elas, prejudicando as futuras análises genômicas (Figura 2). As avaliações e purificações ocorreram a cada sete dias; e após a finalização dessa etapa obtiveram-se 155 isolados.



Figura 2. Purificação dos isolados cultivados a partir de amostras de solo sob essências florestais leguminosas em áreas de regeneração natural Floresta Atlântica do sul do Brasil.

Com as colônias isoladas, iniciou-se as PCR's (Reação em Cadeia da Polimerase), para a amplificação da região 16S e posterior sequenciamento.

2.4 PCR

Para a PCR utilizaram-se enzima *Taq* polimerase, Buffer (tampão), $MgCl_2$, dNTP, primer Y¹, primer Y³, e água destilada. Posteriormente a adição dos reagentes, as amostras foram levadas ao Termociclador Applied Biosystems modelo Veriti® para que a reação ocorresse. O ciclo de amplificação foi de 95°C por 10 segundos e 30 ciclos de 93°C por

30 minutos, 62°C por 45 minutos, 72°C por 30 minutos. Para confirmação da amplificação da região 16S dos isolados, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1%, coradas com brometo de etídeo e fotografadas sob luz UV, para visualização das bandas. As amostras que não apresentaram as bandas desejadas passaram pela PCR novamente até que ocorresse a amplificação.

2.5 Tratamento do produto amplificado para sequenciamento

O produto amplificado foi tratado adicionando-se 1 µL de mix de EXO/SAP e água Milli-Q e retornou para o termociclador à temperatura de 37°C por 60 minutos e à 80°C por 15 minutos. Este é um método para a purificação dos produtos de PCR que utiliza Exonuclease I para digerir excesso de primers e Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) para degradar excesso de nucleotídeos provenientes da PCR.

2.6 Reação de sequenciamento

Para a reação de sequenciamento adicionaram-se em cada amostra 2,5 µL de DNA, 1 µL de Big Dye terminator, 0,5 µL de primer Y³ e 3 µL de Save Money (tampão) e completou-se o volume para 10 µL. Após preparação as amostras foram levadas para o termociclador em um ciclo de 96°C por 10 minutos, 60°C 10 minutos (35 vezes).

O produto da reação de sequenciamento foi precipitado com 2 µL de acetato de amônio, 10 µL de água Milli-Q, 66 µL de ETOH absolut voltando para o termociclador entre 15 a 45 segundos. Após realizou-se nova amplificação com 8 µL do mix de Taq polimerase, Buffer (tampão), MgCl₂, dNTP marcado, primer Y¹, primer Y³, e água destilada.

2.7 Sequenciamento

A corrida eletroforética das reações de sequenciamento foi realizada no sequenciador Applied Biosystems® 3500xL Genetic Analyzer.

2.8 Análise das sequências

As sequências foram analisadas no programa BioEdit e submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos no banco de dados do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI), através do BLASTn para comparação com sequências homólogas depositadas no GenBank obtendo-se a similaridade com outras espécies existentes e classificação taxonômica de cada isolado e serão depositadas neste mesmo banco.

2.9 Estoque dos isolados

Após análise das sequências foram descartados os isolados que se repetiram e os demais foram estocados respeitando seus meios de origem.

2.10 Análises estatísticas

Foi adotado o delineamento inteiramente casualizado, sendo os tratamentos representados pelas espécies em estudo e as repetições pelo número de indivíduos sob os quais foram realizadas as coletas de solo. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). As diferenças entre as médias foram asseguradas pelo teste de Tukey (5% de probabilidade).

Dados químicos e de espécie foram submetidos à Análise Discriminante a fim de identificar variáveis que melhor discriminam os grupos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas áreas avaliadas, os resultados do sequenciamento do gene 16S indicaram os indivíduos amostrados pertencem aos filos *Proteobacteria*, representando 90,4%, e nos filos *Firmicutes* e *Actinobacteria*, representando, cada um, 4,8% da comunidade avaliada. Estes filos abrigam cerca de 90% das espécies bacterianas conhecidas (Nunes, 2006).

Os microrganismos do filo *Actinobacteria* representam, aproximadamente, 13% da comunidade bacteriana no solo, podendo influenciar no desenvolvimento das plantas e na produção de hormônios vegetais, elevando a disponibilidade de nutrientes minerais e atuando na proteção contra patógenos na rizosfera (Hamdali et al., 2008; Janssen, et al., 2002; Vasconcellos et al., 2010). Indivíduos deste filo apresentam a parede celular com grande resistência dificultando a extração do seu DNA, assim, a detecção desses microrganismos é menos eficaz por métodos moleculares do que pelos métodos dependentes de cultivo, como os utilizados neste estudo (Janssen, 2006).

No filo *Firmicute*, encontram-se indivíduos aeróbicos e anaeróbicos, capazes de desenvolver-se em momentos de abundância nutricional e formar esporos em momentos de escassez. Pode-se atribuir esta característica ao número reduzido, cerca de 2%, dos clones das bases de dados obtidas a partir de amostras de solo, resultado da dificuldade de extrair o DNA dos esporos (Atlas & Bartha, 1997; Janssen, 2006).

O filo *Proteobacteria* é constituído pelo maior e mais diverso grupo de bactérias; participa ativamente no ciclo do nitrogênio sendo constituído por cinco classes: *Alphabacteria*, *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* e *Epsilonproteobacteria* (Moreira & Siqueira, 2006; Nusslein & Tiedje, 1999). Neste estudo foram encontradas as classes alpha (28,6%), beta (23,8%) e gamma (38,1%). As ordens encontradas foram *Caulobacterales*, *Rhodospirillales* e *Rhizobiales* em alpha; *Burkholderiales* em beta; e *Nevskiales*, *Pseudomonales*, *Enterobacteriales* e *Xanthomonadales* em gamma. Dentre eles, para alpha e beta, os mais representativos foram, respectivamente, *Rhizobiales* (66,7%) e *Xanthomonadales* (37,5%) (Tabela 1).

Cassetari (2010), em estudo de bactérias diazotróficas na Mata Atlântica de São Paulo, encontrou predominância dos mesmos filos e classes de *Proteobacteria*. Smit et al. (2001), após revisão da literatura, verificaram que em solos com alto teor de matéria orgânica, as proteobactérias, em especial alpha e gamma, apresentaram altas taxas de

ocorrência. No entanto, mesmo possuindo a maior quantidade de isolados descritos, a maioria das espécies de proteobactéria do solo não é cultivável (Spain et al., 2009).

Os membros de *Betaproteobacteria* e *Gammaproteobacterias* são normalmente detectados no solo, no entanto não representam grande abundância como *Alphaproteobacteria*. Em beta tem-se alguns exemplos de mediadores da nitrificação e de gamma algumas espécies do gênero *Pseudomonas* (Gupta, 2000). A ocorrência de beta é em ambientes onde o desenvolvimento e estabelecimento de alfa é dificultado (Chen et al., 2008; Reis et al., 2010; Chien et al., 2010).

Nas regiões de estudo, observou-se maior diversidade de gêneros nos solos sob *A. anthelmia*, com 14 gêneros, seguidos por *P. rohri* e *I. edulis*, com 9 gêneros cada. Em relação ao número de indivíduos observa-se a mesma tendência visualizada para os gêneros (Figura 3).

Apesar das leguminosas pertencerem a uma das maiores famílias botânicas (Fabaceae) não existem informações sobre sua capacidade de nodular, especialmente espécies florestais tropicais. A principal razão da falta de estudos sobre a biodiversidade das leguminosas e sua propriedade nodulífera, além de sua ampla distribuição na região tropical e subtropical, está na grande plasticidade dos hábitos de crescimento e nas características ecológicas das espécies (Faria et al., 1999; Souza, 2010), representando um potencial que deve ser explorado.

Tabela 1. Classificação dos grupos de bactérias em áreas de regeneração natural da Mata Atlântica do Sul do Brasil. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.

Domínio	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero			
Bacteria	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Corynebacteriales</i>	<i>Mycobacteriaceae</i>	<i>Mycobacterium</i>			
				<i>Paenibacillaceae</i>	<i>Brevibacillus</i>			
	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Caulobacterales</i>	<i>Caulobacteraceae</i>	<i>Phenylobacterium</i>		
					<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Agrobacterium</i>		
				<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>Phyllobacteriaceae</i>	<i>Rhizobium</i>	
						<i>Mesorhizobium</i>		
						<i>Bradyrhizobiaceae</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	
						<i>Rhodospirillales</i>	<i>Rhodospirillaceae</i>	<i>Azospirillum</i>
				<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Alcaligenaceae</i>	<i>Pigmentiphaga</i>
							<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderia</i>
							<i>Cupriavidus</i>	
							<i>Comamonadaceae</i>	<i>Comamonas</i>
							<i>Limnohabitans</i>	
							<i>Citrobacter</i>	
				<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Cedecea</i>
							<i>Nevskiales</i>	<i>Sinobacteraceae</i>
<i>Pseudomonales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>						
<i>Xanthomonadales</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Stenotrophomonas</i>						
	<i>Rhodanobacteraceae</i>	<i>Dyella</i>						
	<i>Fulvimonas</i>							
<i>Neiella</i>								

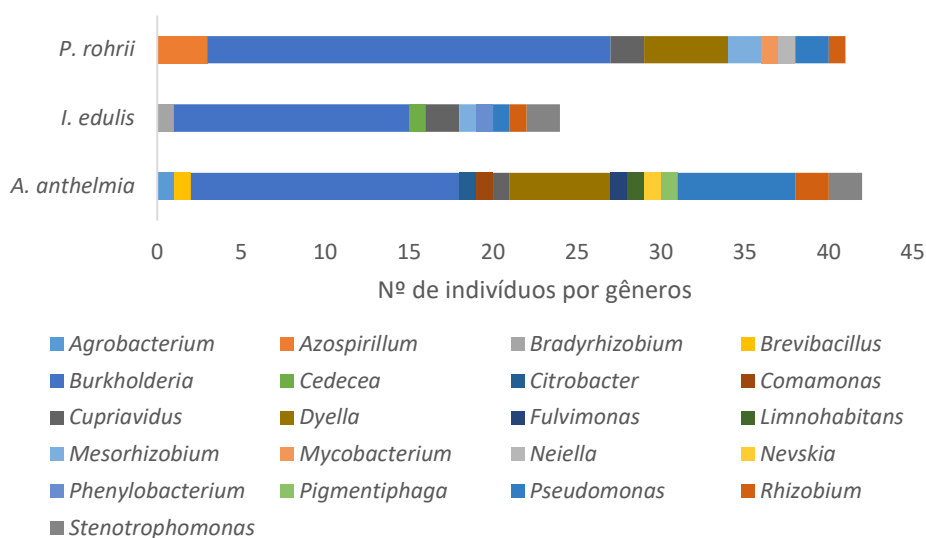


Figura 3. Quantidade de indivíduos de diferentes gêneros de bactérias sob essências florestais leguminosas da Mata Atlântica do Sul do Brasil. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.

O gênero *Burkholderia*, pertencente a ordem *Betaproteobacteria*, foi o mais abundante, somando 50,5% do total. Sob cada espécie avaliada encontrou-se valores de 38,1 % em *A. anthelmia*, 58,3% em *I. edulis* e 58,54% em *P. rohrii* (Figura 4). Este gênero tem sido associado com o desenvolvimento de nódulos em diversas leguminosas em diversos ambientes (Silva, 2006) e foi descoberto por Gillis et al. (1995), quando descreveu a espécie *B. vietnamiensis*. Esta capacidade foi encontrada posteriormente para outras espécies como *B. tuberum*, *B. unamae*, *B. tropica*, *B. mimosarum* e *B. nodosa* (Vandamme et al., 2002; Caballero-Mellado et al., 2004; Reis et al., 2004; Chen et al., 2006; Chen et al., 2007), todas encontradas no presente estudo.

Silva et al. (2012), ao estudar solos da região Amazônica no Brasil, observaram que 96% das estirpes de *Burkholderia* apresentaram capacidade de solubilização de fosfato de cálcio.

Seguido do gênero *Burkholderia*, está *Dyella*, uma gammaproteobacteria, somando com abundância relativa de 10,3% do total, encontradas sob *A. anthelmia* (14,3%) e *P. rohrii* (10,2%); *Pseudomonas* (9,35%) com 16,7% sob *A. anthelmia*, 4,2%, sob *I. edulis* e 4,9% sob *P. rohrii*; e *Cupriavidus* (4,7%) com 2,4% sob *A. anthelmia*, 8,3% sob *I. edulis* e 4,9% sob *P. rohrii*.

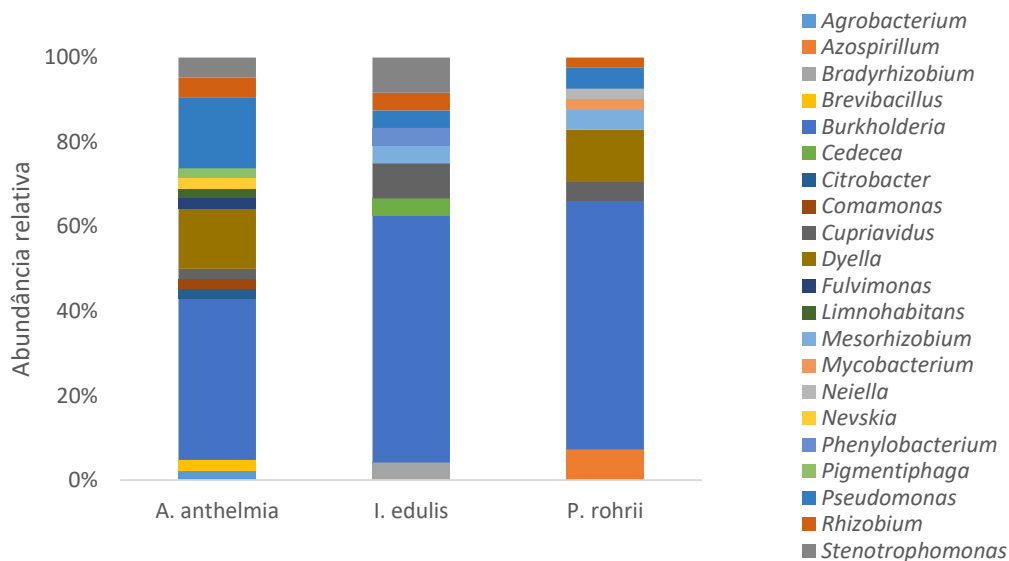


Figura 4. Abundância relativa dos gêneros de bactérias encontradas sob essências florestais leguminosas da Mata Atlântica do Sul do Brasil. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.

Bactérias fixadoras de N que podem associar-se as plantas estão presentes nos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Devosia*, *Blastobacter*, *Burkholderia* e *Ralstonia*. Enquanto as de vida livre ou associativas fazem parte dos gêneros *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Pseudomonas* (Jordan, 1982; Chen et al., 1988; Dreyfus et al., 1988; Frank, 1989; Jarvis et al., 1997; De Lajudie et al., 1998; Chen et al., 2001; Sy et al., 2001; Vandamme et al., 2002; Berkum & Eardly, 2002; Rivas et al., 2003; Benhizia et al., 2004; Hayat et al., 2010).

Os gêneros mais frequentes foram *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Pseudomonas* e *Rhizobium*, e juntas representam 37,5% da frequência de todos os gêneros (Figura 5).

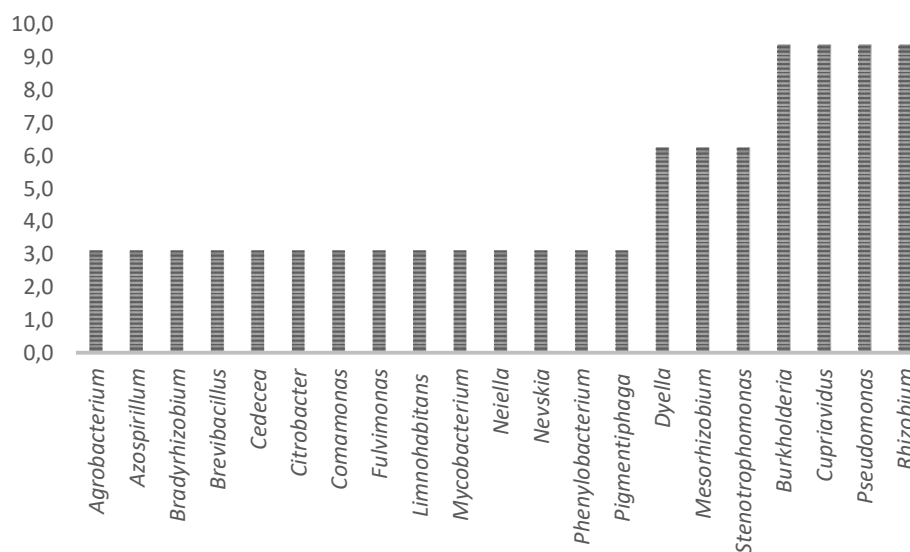


Figura 5. Frequência relativa dos gêneros de bactérias encontradas sob essências florestais leguminosas da Mata Atlântica do Sul do Brasil. Reserva Natural da Guaricica, Antonina – PR.

Até alguns anos atrás acreditava-se que a nodulação de leguminosas ocorresse apenas por *Alphabacterias*, porém, atualmente sabe-se que membros da classe *Betaproteobacteria*, em especial dos gêneros *Burkholderia* e *Cupriavidus* (e *Gammaproteobacteria*, como os pertencentes ao gênero *Pseudomonas* (Moulin et al., 2001; Shiraishi, 2010; Chen et al., 2001) possuem essa capacidade.

O gênero *Pseudomonas* é pertencente à família *Pseudomonadaceae*, possui espécies de grande diversidade metabólica e com capacidade de colonizar uma vasta gama de nichos no ambiente, incluindo o solo e as plantas. Como consequência da sua notável adaptabilidade, o número de espécies é crescente (Stanier, 1969; Palleroni, 2010).

Pesquisas com isolados de *Pseudomonas* demonstram que atuam como promotores de crescimento quando inoculados em raízes de plantas, como solubilizadores de fosfatos e formadores de sideróforos no solo (Kloepper et al., 1980; Benizri et al., 1997; Di Simine et al., 1998). Outros pesquisadores, como Benhizia e colaboradores (2004) e Ibañes e colaboradores (2009) isolaram bactérias desse Gênero em nódulos radiculares de algumas leguminosas.

O gênero *Cupriavidus* atualmente possui 14 espécies que habitam diversos ecossistemas, como solo, água, nódulos de plantas leguminosas Além de fixar nitrogênio em nódulos de leguminosas, este gênero também é conhecido por apresentar indivíduos

promotores de crescimento (Estrada de los Santos et al., 2014). *Cupriavidus sp.* é capaz de sintetizar o fitormônio AIA, *Cupriavidus necator* é solubilizador de fosfatos e *Cupriavidus alkaliphilus* pode sintetizar sideróforos em meio de cultura (Yu et al. 2011, Pong Silp et al., 2012; Estrada-de los Santos et al. 2012). Ainda é possível encontrar espécies, como *Cupriavidus metallidurans*, observada nas áreas deste estudo, capaz de crescer na presença de metais pesados como mercúrio, zinco, níquel, arsênio, entre outros (Monchy et al. 2007; Zhang et al. 2009). A espécie *Cupriavidus plantarum* não tem capacidade de fixar N (Estrada de los Santos et al., 2014).

O gênero *Rhizobium*, descrito por Frank (1889), apresentou seus primeiros relatos taxonômicos com base na planta hospedeira da qual os isolados eram obtidos e teve como primeira espécie *Rhizobium leguminosarum*. Pertencente ao filo *Alphaproteobacteria*, da ordem *Rhizobiales*, inicialmente foram agrupados em uma única família, a *Rhizobiaceae*; e posteriormente às análises do gene 16S rDNA, foram subdivididos em diferentes famílias (Garrity & Holt, 2001). Este gênero constitui-se de bactérias quimiorganitróficas e gram-negativas.

Ao encontrar, neste estudo, menor frequência do gênero *Rhizobium* quando comparado ao gênero *Burkholderia*, pode-se atribuir tais dados à capacidade adaptativa do grupo de alfabactérias em relação a *Rhizobium*, como visto por Chen et al. (2005).

Em relação a diversidade de espécies bacterianas encontradas sob cada uma das essências florestais é possível observar maior índice de diversidade nas amostras sob *P. rohrii* seguido de *I. edulis* e *A. anthelmia*.

Ao aplicar análise discriminante dos dados químicos, de espécies de bactérias encontradas e essências florestais, obteve-se a figura 6. Como a primeira função é responsável por 78,45% da discriminação entre os grupos, pode-se afirmar que essas distâncias são aquelas de maior relevância na separação dos quatro grupos formados. Foi possível observar a distinção das espécies florestais leguminosas, com características químicas como pH, P, K, Ca e Mg agrupados ao *I. edulis*. É possível visualizar a predominância dos gênero *Burkholderia* sob as três essências, bem como a presença das *Alphaproteobactérias*, grupo simbiote característico pela fixação de N₂.

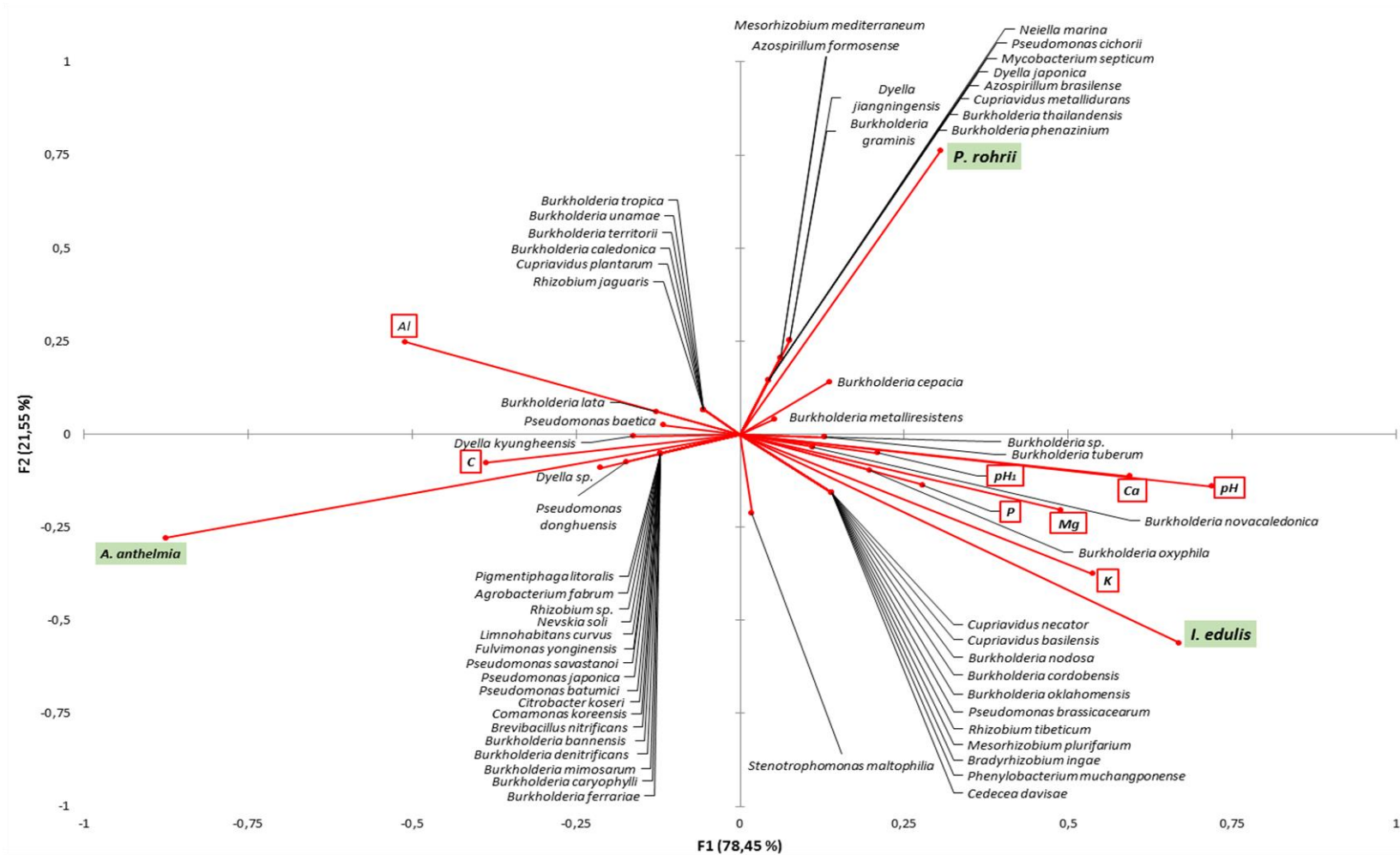


Figura 6. Análise discriminante dos parâmetros químicos, espécies de bactérias e essências florestais em área de regeneração natural da Mata Atlântica do sul do Brasil.

Fazendo uma análise sob a perspectiva das áreas avaliadas, sabe-se que estas apresentam estágios sucessionais diferentes, onde as áreas denominadas Pinheiro e Ferro 10 pertencem à formação de floresta primária, com cerca de 200 e 90 anos, respectivamente, enquanto Corvo e Ferro 7 fazem parte de uma formação de floresta secundária, com cerca de 60 e 75 anos, respectivamente (Capretz, *in press*).

Avaliando as características químicas das áreas de estudo (Figura 7), é possível observar que todas apresentam solos ácidos, com valores de pH mais elevados na área Pinheiro. As comunidades microbianas do solo são diretamente influenciadas por este parâmetro químico, pois baixos valores de pH podem favorecer a solubilização de fosfatos (Jones & Darrah, 1994). A acidez do solo pode estar relacionada aos altos teores de carbono encontrados, predizendo grande quantidade de matéria orgânica. Corroborando com essas informações, foi possível observar a presença de microrganismos solubilizadores de fosfato em todas as áreas amostradas. Esses dados podem, também, ser relacionados aos baixos teores de fósforo encontrados implicando na necessidade da presença desses microrganismos em áreas como essas.

Fatores como pH e disponibilidade de nutrientes, afetam diretamente a produção vegetal, além de serem determinantes para a permanência de uma comunidade microbiana no solo (He et al., 2007).

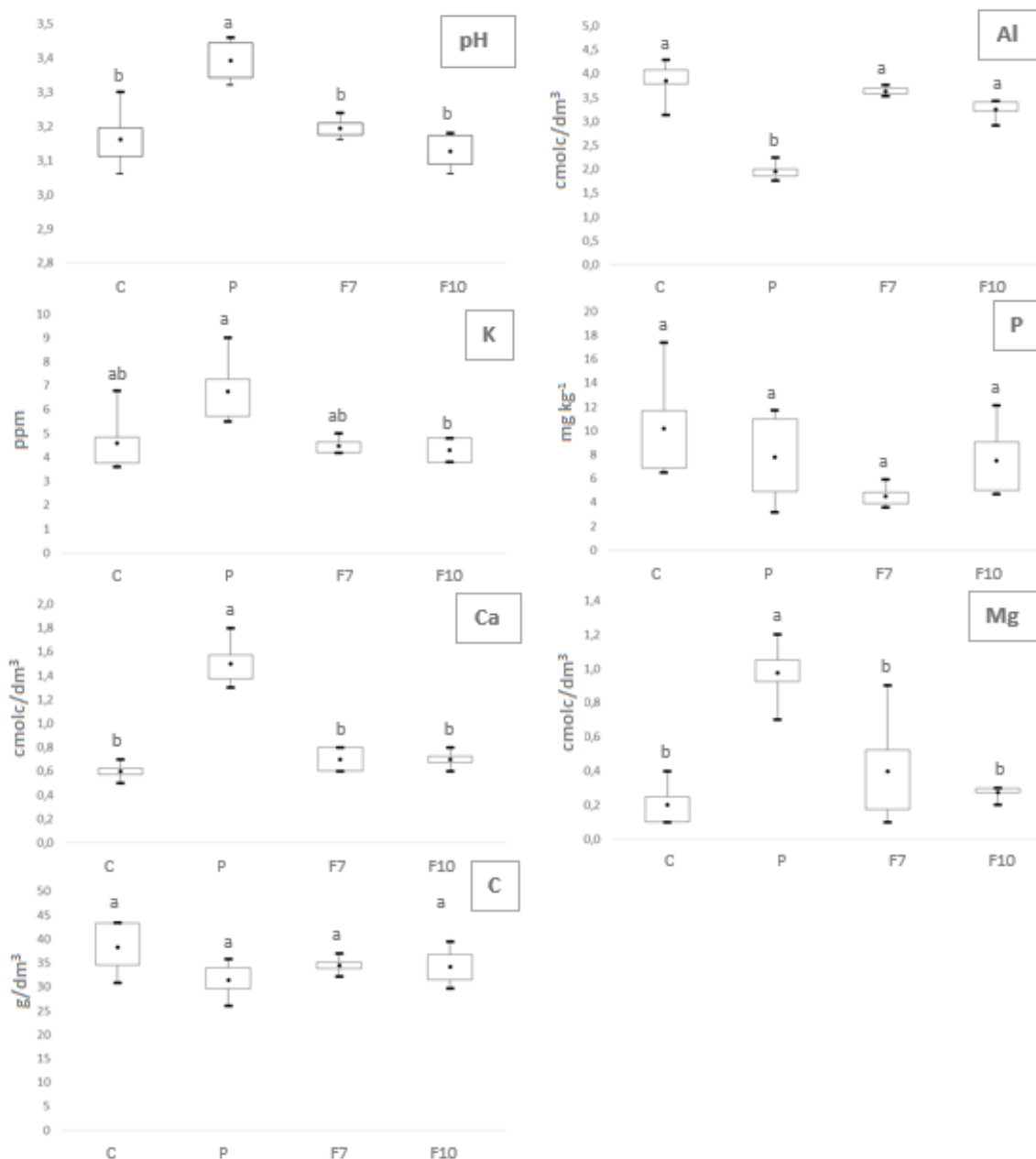


Figura 7. Avaliação química do solo (pH, Alumínio, Potássio, Fósforo, Cálcio, Magnésio e Carbono) sob essências florestais leguminosas da Mata Atlântica do Sul do Brasil (C – Corvo 6; P – Pinheiro; F7 – Ferro 7; F10 – Ferro 10).

Considerando os parâmetros químicos anteriormente citados, através de análise discriminatória, é visível a distinção da área Pinheiro em relação às demais (Figura 8). Esta área possui, aproximadamente, 200 anos e possui formação primária, sem grandes alterações ao longo do tempo, indicando maior estabilidade nas características metabólicas e químicas do solo, bem como na comunidade microbiana existente. Gerhing (2003) estudando o papel da FBN em floresta primária e secundária na Amazônia Central

relatou que a contribuição das leguminosas e conseqüentemente da fixação de nitrogênio em floresta secundária é muito maior que em floresta primária, apresentando uma importância muito maior em áreas em regeneração do que em florestas clímax.

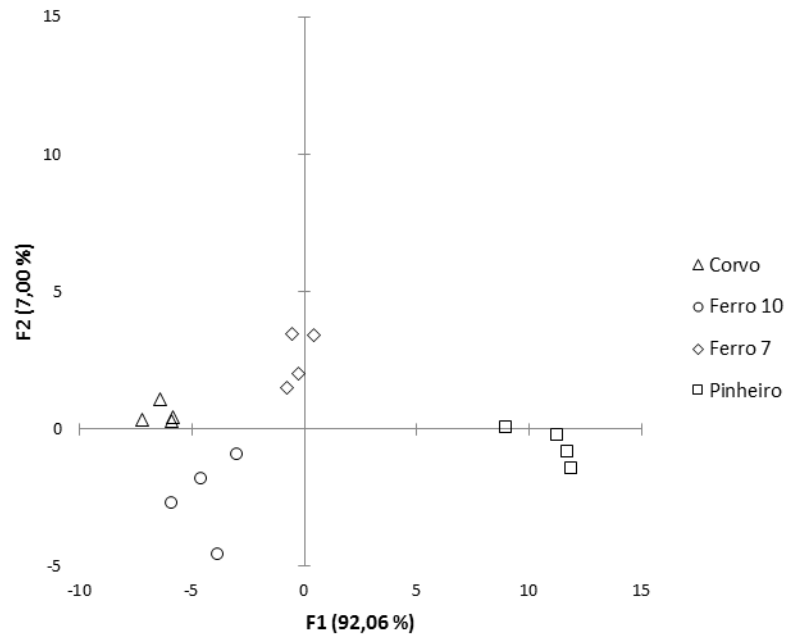


Figura 8. Análise discriminante dos atributos químicos (pH, C, P, K, Ca e Mg) em áreas de regeneração natural da Mata Atlântica do Sul do Brasil.

4 CONCLUSÃO

Os microrganismos encontrados nas áreas de estudo pertencem exclusivamente ao domínio *Bacteria*, com representantes dos filos *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Firmicutes*.

O filo mais abundante foi *Proteobacteria*, participante ativo no ciclo do nitrogênio, indicando que nestas áreas a atividade e a diversidade microbiana são fatores determinantes para a regeneração e manutenção florestal.

Indivíduos da ordem *Rhizobiales* mostraram-se presentes, indicando que nestas áreas pode ocorrer a Fixação Biológica de Nitrogênio por associações simbióticas entre as bactérias e essências florestais leguminosas.

A essência florestal que apresentou maior diversidade de gêneros no solo sob sua copa foi o *A. anthelmia*, seguida de *P. rohrii*, espécie com estudos incipientes acerca de sua capacidade de associar-se simbioticamente com espécies de bactérias nodulíferas e *I. edulis*, espécie reconhecida por fazer FBN através de associações simbiotes.

Os gêneros mais frequentes foram *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Pseudomonas* e *Rhizobium*, espécies contribuintes na FBN bem como na solubilização de fosfatos, atividades de grande valia na ciclagem de nutrientes nos ecossistemas.

A idade da floresta mostrou-se um fator importante na distinção entre áreas quanto a sua população microbiana, sendo as florestas mais velhas caracterizadas por maior estabilidade em relação às demais.

5 LITERATURA CITADA

ATLAS, R. M.; BARTHA, R. Microbial Ecology; Fundamentals and Applications, 4ed. Addison-Wesley Pub, 306 p., 1997.

BARRET, C.F.; PARKER, M.A. Prevalence of Burkholderia sp. Nodule symbionts on four mimosoid legumes from Barro Colorado Island, Panama. Systematic and Applied Microbiology, Jena, v. 28, p. 57-65, 2005.

BENHIZIA, Y.; BENHIZIA, H.; BENGUEDOUAR, A.; MURESU, R.; GIACOMINI, A.; SQUARTINI, A. Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus Hedysarum. Systematic and Applied Microbiology, v. 27, p. 462-468, 2004.

BENIZRI, E.; SCHOENY, A.; PICARD, C.; COURTADE, A.; GUCKERT, A. External and internal root colonization of maize by two Pseudomonas strains: enumeration by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Current Microbiology, v. 34, p. 297-302, 1997.

BERKUM, P. van; EARDLY, B. D. The aquatic budding bacterium Blastobacter denitrificans is a nitrogen-fixing symbiont of Aeschynomene indica. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 68, n. 3, p. 1132-1136, 2002.

CAPRETZ, R.L.; BRIETEZ, R.M.; BEBBER, D.P.; REGINATO, M.; ZWIENER, V.P. Floristic and structural patterns along a successional chronosequence in the Atlantic Forest of Southern Brazil. In press.

CASSETARI, A.S. Diversidade de bactérias diazotróficas nodulíferas da Mata Atlântica. 98 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2010.

CHEN, W. X.; YAN, G. H.; LI, J. L. Numerical taxonomic study of fastgrowing soybean rhizobia and a proposal that Rhizobium fredii be assigned to Sinorhizobium gen. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, Reading, v. 38, n. 4, p. 392-397, 1988

CHEN, W.M.; FARIA, S.M.; JAMES, E.K.; ELLIOT, G.N.; LIN, J.H.; CHOU, J.H.; SHEU, S.Y.; CNOCKAERT, M.; SPRENT, J.I.; VANDAMME, P. *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Reading, v. 57, n. 5, p. 1055-1059, 2007.

CHEN, W.M.; FARIA, S.M.; STRALIOTTO, R.; PITARD, R.M.; ARAÚJO, J.L.S.; CHOU, J.H.; CHOU, Y.J.; BARRIOS, E.; PRESCOTT, A.R.; ELLIOTT, G.N.; SPRENT, J.I. Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: a study of novel *Mimosa*-nodulating strains from South America. *Applied and Environmental Microbiology*, v.71, p.7461-7471, 2005.

CHEN, W.M.; JAMES, E.K.; COENYE, T.; CHOU, J.H.; BARRIOS, E.; FARIA, S.M.; ELLIOT, G.N.; SHEU, S.Y.; SPRENT, J.I.; VANDAMME, P. *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Reading, v. 56, n. 8, p. 1847-1851, 2006.

CHEN, W.M.; LAESENS, S.; LEE, T.M.; COENYE, T.; DE-VOS, P.; MERGEAY, M.; VANDAMME, P. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.51, p.1729-1735, 2001.

CHEN, W.M.; WU, C.H.; JAMES, E.K.; CHANG, J.S. Metal biosorption capability of *Cupriavidus taiwanensis* and its effects on heavy metal removal by nodulated *Mimosa pudica*. *Journal of Hazardous Materials*, v. 151, p. 364-371, 2008.

CHEN, Y.S.; YANAGIDA, F.; SHINOHARA, T. Isolation and identification of lactic acid bacteria from soil using an enrichment procedure. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v. 40, n.3, p. 195-200, 2005.

CHIEN, C.H.; HONG, C.C.; SOO, P.C.; WEI, Y.H.; CHEN, S.Y.; CHENG, M.L.; SUN, Y.M. Functional Expression of *phaCAB* Genes from *Cupriavidus taiwanensis* Strain 184

in *Escherichia coli* for Polyhydroxybutyrate Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 162, p. 2355-2364, 2010.

DE LAJUDIE, P. LAURENT-FULELE, E.; WILLEMS, A.; TORCK, U.; COOPMAN, R.; COLLINS, M.D.; KERSTERS, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogenfixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Reading, v. 48, n. 4, p. 1277-1290, 1998.

DÖBEREINER, J. Forage grasses and grain crops. In: BERGERSEN, F.J. ed. *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*. New York, John Wiley & Sons, 1980. p.535-555.

FARIA, S.M.; LIMA, H.C.; OLIVARES, F.L.; MELO, R.B.; XAVIER, R.P. Nodulação em espécies florestais: especificidade hospedeira e implicações na sistemática de Leguminosae. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E.; CARVALHO, J.G. (Ed.). *Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas*. Lavras: SBCS; UFLA, DCS, 1999. p. 667-686.

FRANK, B. Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, Berlin, v. 7, p. 332-346, 1889.

GARAU, G.; YATES, R.J.; DEIANA, P.; HOWIESON, J.G. Novel strains of nodulating *Burkholderia* have a role in nitrogen fixation with papilionoid herbaceous legumes adapted to acid, infertile soils. *Soil Biology & Biochemistry*, Oxford, v. 41, p. 125-134, 2009.

GEHRING, C. O papel da fixação biológica de nitrogênio em Floresta Secundária e Primária da Amazônia Central. Dissertação – Faculdade de Agronomia Friedrich-Wihelm, Universidade de Bonn, 2003.

GOEL, A.K.; SINDHU, S.S.; DADARWAL, K.R. Stimulation of nodulation and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.) by *Pseudomonas* spp. antagonistic to fungal pathogens. *Biology and Fertility of Soils*, v. 36, p. 391-396, 2002.

GUPTA, R.S. The phylogeny of proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, Hoboken, v. 24, n. 4, p. 307-319, 2005.

HAMDALI, H.; HAILIDE, M.; VIROLLE, M.J.; QAHDOUCH, Y. Screening for rock phosphate solubilizing actinomycetes from Moroccan phosphate mines. *Appl. Soil Ecol.* 38, 12-19.

IBAÑEZ, F.; ANGELINI, J.; TAURIAN, T.; TONELLI, M.L.; FABRA, A. Endophytic occupation of peanut root nodules by opportunistic Gammaproteobacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 32, p. 49-55, 2009.

JANSSEN, P.H. Identifying the dominant soil bacterial in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 72, n. 3, 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, n.5, p. 2391-2396, 2002.

JARVIS, B. D. W. et al. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Reading, v. 47, n. 3, p. 895-898, 1997.

JARVIS, B.D.W.; DOWNER, H.L.; YOUNG, J.P.W. Phylogeny of fast-growing soybean-nodulating rhizobia supports synonymy of *Sinorhizobium* and *Rhizobium* and assignment to *Rhizobium fredii*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 42, p. 93-96, 1992.

JORDAN, D. C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Reading, v. 32, n. 1, p. 136-139, 1982.

KIRK, J.L.; BEAUDETTEA, L.A.; HARTB, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOSB, J.N.; LEEA, H.; TREVORSA, J.T. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, v.58, p. 169-188, 2004.

MAGALHÃES, F.M.; BALDANI, J.I.; SOUTO, S.M.; KUYKENDALL, J.R.; DÖBEREINER, J.A. A new acid tolerant *Azospirillum* species. *Anais da academia Brasileira de Ciência*, v.55, p. 417-430, 1983.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O., BRUSSAARD, L. *Biodiversidade do Solo em Ecossistemas Brasileiros*. Lavras: UFLA, 2008. 768p.

MOULIN, L; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOLVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of beta sub-class of Proteobacteria. *Nature*, v. 411, p. 948-950, 2001.

PALLERONI, N. J. (2010) The *Pseudomonas* Story. *Environmental Microbiology*, v. 12, p. 1377 – 1383, 2010.

REIS, F.B.; SIMON, M.F.; GROSS, E.; BODDEY, R.M.; ELLIOTT, G.N.; NETO, N.E.; LOUREIRO, M.F. QUEIROZ, L.P.; SCOTTI, M.R.; CHEN, W.M.; NORÉN, A.; RUBIO, M.; FARIA, S.M.; BONTEMPS, C.; GOI, S.R.; YOUNG, L.P.W.; SPRENT, J.I.; JAMES, E.K. Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. *New Phytologist*, v. 186, p. 934-946, 2010.

REIS, V.M.J; ESTRADA, S.P; TENORIO-SALGADO, S.; VOGEL, J.; STOFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V.L.; SCHMID, M.; BALDANI, J.I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN, A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated

bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.54, n. 6, p. 2155-2162, 2004.

RIVAS, R. et al. Description of *Devosia neptuniae* sp. nov. that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India. *Systematic and Applied Microbiology*, Stuttgart, v. 26, n. 1, p. 47-53, 2003.

SHIRAIISHI, A.; MATSUSHITA, N.; HOUGETSU, T. Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. and the Betaproteobacteria *Burkholderia* sp. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 33, p. 269-274, 2010.

SHIRAIISHI, A.; MATSUSHITA, N.; HOUGETSU, T. Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. and the Betaproteobacteria *Burkholderia* sp. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 33, p. 269-274, 2010.

SILVA, V.N.; SILVA, L.E.S.F.; MARTÍNEZ, H.A.B; FIGUEIREDO, M.V.B. Estirpes de *Paenibacillus* promotoras de nodulação específica na simbiose *Bradyrhizobium*-Caupi. *Acta Scientiarum Agronomy*. Maringá, v.9, n.3, p.331-338, 2007.

SMIT, E.; LEEFLANG, P.; GOMMANS, S.; VAN DEN BROEK, J.; VAN, M. S.; WERNARS, K. 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. 2284-2291, 2001.

SOUZA NETO, E.R. Perdas de nitrogênio pela emissão de óxido nitroso (N₂O) e sua relação com a decomposição da serapilheira e biomassa de raízes da Floresta de Mata Atlântica. 2008. 80 p. Dissertação (Mestrado em Química Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

STANIER, R.Y. Grupos importantes de eubactérias unicelulares. In: *Mundo dos Micróbios*. Cap.18, 1969.

SY, A. et al. Methylophilic Methylobacterium bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 183, n. 1, p. 214-220, 2001.

DREYFUS, B.; GARCIA, J.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Reading, v. 38, n. 1, p. 89-98, 1988.

TIMMUSK, S.; GRANTCHAROVA, N.; WAGNER, E.G.H. *Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, p. 7292-7300, 2005.

VANDAMME, P.; GORIS, J.; CHEN, W.M.; DE VOS, P.; WILLEMS, A. *Burkholderia tuberum* sp nov and *Burkholderia phymatum* sp nov nodulate the roots of tropical legumes. *Systematic and Applied Microbiology*, Stuttgart, v. 25, n. 4, p. 507-512, 2002.

VESSEY, J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, v. 255, p. 571-586, 2003.