

**Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Ecologia  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia**

**Diversidade de comunidades bacterianas de solo de Cerrado em  
resposta a diferentes alterações dos ecossistemas**

**Maria Regina Silveira Sartori da Silva**

**Brasília ó DF  
Setembro de 2012**

**Universidade de Brasília**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Ecologia**  
**Programa de Pós-graduação em Ecologia**

**Diversidade de comunidades bacterianas de solo de Cerrado em resposta a  
diferentes alterações dos ecossistemas**

**Aluna: Maria Regina Silveira Sartori da Silva**

**Orientador: Profa. Mercedes Maria da Cunha Bustamante**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Ecologia da Universidade de  
Brasília, como requisito parcial para obtenção  
do título de Doutor em Ecologia**

**Brasília ó DF**  
**Setembro de 2012**

Tese de Doutorado

**MARIA REGINA SILVEIRA SARTORI DA SILVA**

Título:

**“Diversidade de comunidades bacterianas de solo de cerrado em resposta a diferentes alterações dos ecossistemas”.**

**Banca Examinadora:**



**Profa. Dra. Mercedes Maria da Cunha Bustamante**  
**Presidente / Orientadora**  
**ECL/UnB**

  
**Profa. Dra. Ieda de Carvalho Mendes**  
**Membro Titular**  
**Embrapa**

  
**Profa. Dra. Betânia Ferraz Quirino**  
**Membro Titular**  
**Embrapa**

  
**Profa. Dra. Cynthia Maria Kyaw**  
**Membro Titular**  
**CEL/UnB**

  
**Prof. Dr. José Francisco Gonçalves Júnior**  
**Membro Titular**  
**ECL/UnB**

**Prof. Dr. Helson Mario Martins do Vale**  
**Suplente**  
**FIT/UnB**

Brasília, 03 de setembro de 2012.

Ítalo, Carol e Bela,  
a vocês, mais uma vez,  
dedico.

## Agradecimentos

À minha orientadora Mercedes Bustamante, pela oportunidade de realizar este trabalho, pela orientação, confiança e, principalmente, por seu apoio. Obrigada Mercedes!

Ao meu co-orientador Ricardo Krüger muito obrigada por ter me recebido em seu laboratório e em seu grupo. Obrigada por seu incentivo e paciência.

Aos membros da banca examinadora por compartilharem seu tempo e seu conhecimento. Muito obrigada!

À Prof. Heloísa Miranda, muito obrigada por tudo.

À Prof. Lourdes Amaral (*in memoriam*) obrigada por todo seu carinho e apoio. Sinto que não esteja para compartilhar este meu momento.

À Viviane Miranda, minha ãfiel escudeiraõ, obrigada por toda sua ajuda em campo e no laboratório. Não sei como agradecer.

À Alinne, minha amiga, equilíbrio e ajuda fundamental na vida e também nos trabalhos, de laboratório e análises. Obrigada por compartilhar todos esses momentos comigo.

A todos do laboratório de Ecologia de Ecossistemas, mas um obrigado especial àqueles que estiveram de sol a sol e de chuva a chuva comigo: ao Salomão, a Simone, a Gabi Mineira, a Gabi Lira, ao Jimmy, a Danni, a Carol, a Anninha, a Gleide, a Júlia, muito obrigada amigos!!! Fred, muito obrigada por toda a sua ajuda.

Ao grupo que me acolheu: Lucas, Samuel, Julianna, Carol, Camila, Paula, Elisa, Victória, Fabiano.

À Marcela e a Nathalia, obrigada por dedicarem seu tempo ao meu trabalho.

À Gabriela Nardoto e Arminda Carvalho, obrigada por vocês estarem sempre ao meu lado.

Ao grupo do laboratório de Enzimologia, obrigado por me receberem.

Ao Departamento de Ecologia por todo apoio durante todos esses anos. Muito obrigada Vanessa e Marcelo pela ajuda.

À diretoria e aos funcionários da Reserva Ecológica do IBGE, por permitir a coleta de amostras e a utilização da Reserva.

Ao CRAD/ UnB e ao IEF pelo apoio nas coletas em Paracatu, MG.

À EMBRAPA Cerrados por todo apoio nas coletas. Clodoaldo e seu Osmar, muito obrigada!

A FAPDF/CNPq pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

A todos aqueles que de alguma forma estiveram presentes neste momento da minha vida, que torceram por mim e me ajudaram mesmo sem saber. Obrigada pela amizade, pelo apoio e principalmente pela paciência.

Aos meus pais, Alaôr e Cecília, por todo apoio, paciência e amor sem reservas.

A toda minha família que sempre torceu por mim. Vocês são incríveis!!!!

A Deus, por minha vida ser tão boa.

## INDÍCE

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	ix
RESUMO GERAL	xiii
GENERAL ABSTRACT	xv
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	7
OBJETIVO GERAL E ESTRUTURA DA TESE	10

### CAPÍTULO 1 - DIVERSIDADE MICROBIANA DO SOLO EM PARCELAS DE CERRADO SENTIDO RESTRITO SUBMETIDAS À ADIÇÃO DE NUTRIENTES

Resumo	11
Abstract	12
1. Introdução	13
2. Material e Métodos	17
2.1. Descrição da área de estudo	17
2.2. Delineamento do experimento	17
2.3. Coleta de amostras de solo	21
2.4. Análises físico-químicas do solo	21
2.5. Análises da comunidade bacteriana do solo	22
2.6. Análises estatísticas	24
3. Resultados	25
3.1. Características físico-químicas do solo	25
3.2. Análises da comunidade bacteriana do solo	32
4. Discussão	45
5. Conclusões	52
6. Referências Bibliográficas	53

### CAPÍTULO 2 - EFEITOS DA INVASÃO POR GRAMÍNEAS EXÓTICAS SOBRE AS COMUNIDADES MICROBIANAS EM SOLOS DE CERRADO

Resumo	58
Abstract	59
1. Introdução	60
2. Material e Métodos	63
2.1. Estudo em condição de campo	63
2.1.1. Área de estudo	63
2.1.2. Coleta de amostras de solo	63
2.2. Experimento com plantas envasadas em casa de vegetação	64
2.3. Análises físico-químicas dos solos	67
2.4. Análises da comunidade bacteriana do solo	67
2.5. Análises estatísticas	69
3. Resultados	70
3.1. Estudo em condição de campo	70
3.1.1. Características físico-químicas dos solos	70

3.1.2. Análises da comunidade bacteriana do solo	72
3.2. Experimento com plantas envasadas em casa de vegetação	76
3.2.1. Características físico-químicas dos solos	76
3.2.2. Análises da comunidade bacteriana do solo	78
3.2.3. Variações na arquitetura e biomassa de raízes	86
4. Discussão	90
5. Conclusões	96
6. Referências Bibliográficas	98

### CAPÍTULO 3 - EFEITOS DO PLANTIO DE ARBÓREAS EM UMA PASTAGEM SOBRE A COMUNIDADE BACTERIANA DO SOLO

Resumo	101
Abstract	102
3.1. Introdução	103
3.2. Material e Métodos	105
3.2.1. Descrição da área de estudo	105
3.2.2. Coleta de amostras de solo	109
3.2.3. Análises físico-químicas dos solos	110
3.2.4. Análises da comunidade bacteriana do solo	111
3.2.5. Análises estatísticas	112
3. Resultados	113
3.3.1. Características físico-químicas do solo	113
3.3.2. Análises da comunidade bacteriana do solo	120
4. Discussão	130
5. Conclusões	135
6. Referências Bibliográficas	136
CONSIDERAÇÕES FINAIS	139



## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Mapa de vegetação da Reserva Ecológica do IBGE (RECOR-IBGE).....	19
Figura 2. Mapa das parcelas do projeto "Estudo dos Efeitos das Mudanças Globais que Determinam a Estrutura e o Funcionamento de Ecossistemas de Cerrado".....	20
Figura 3. Distribuição da precipitação mensal (mm) durante o período de agosto de 2009 a dezembro de 2009.....	27
Figura 4. Valores médios do teor de umidade no solo (%) obtidos em parcelas de cerrado sentido restrito submetidas à adição de nutrientes, no intervalo de 0 a 10 cm de profundidade do solo, entre agosto de 2009 a dezembro de 2009.....	27
Figura 5. Valores médios de pH em H <sub>2</sub> O (A) e de pH em CaCl <sub>2</sub> (B), concentrações de N-NO <sup>-3</sup> (mg/kg) (C) e N-NH <sup>+4</sup> (mg/kg) (D) obtidos em parcelas de cerrado sentido restrito submetidas à adição de nutrientes, no intervalo de 0 a 10 cm de profundidade do solo, no período de agosto de 2009 a dezembro de 2009.....	28
Figura 6. Concentrações de P (A), K (B) (mg/dm <sup>3</sup> ), Mg (C), Al (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> ) (D) e Ca disponíveis (mg/dm <sup>3</sup> ) (E) obtidas em parcelas de cerrado sentido restrito submetidas à adição de nutrientes, no intervalo de 0 a 10 cm de profundidade do solo, no período de agosto de 2009 e dezembro de 2009. ....	29
Figura 7. Teor de matéria orgânica (g/kg) (A) e capacidade de troca catiônica (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> ) (B) obtidas em parcelas de cerrado sentido restrito submetidas à adição de nutrientes, no intervalo de 0 a 10 cm de profundidade do solo, no período de agosto de 2009 e dezembro de 2009.....	30
Figura 8. Análise dos componentes principais (PCA) com os parâmetros químicos dos solos analisados.....	31
Figura 9. Frequência dos filos bacterianos dominantes presentes no solo de áreas de cerrado sentido restrito submetidos à adição de nutrientes, de acordo com análises de pirosequenciamento.....	35
Figura 10. Frequência dos filos bacterianos menos abundantes presentes no solo de áreas de cerrado sentido restrito submetidos à adição de nutrientes, de acordo com análises de pirosequenciamento.....	36
Figura 11. Diferenças significativas (p < 0,05) entre filos bacterianos mais abundantes presentes no solo de cerrado sentido restrito submetidos à adição de nutrientes por meio do programa STAMP utilizando o teste ANOVA -Tukey-Kramer.....	37
Figura 12. Diferenças significativas (p < 0,05) entre filos bacterianos mais abundantes presentes no solo de cerrado sentido restrito submetidos à adição de nutrientes por meio do programa STAMP utilizando o teste ANOVA -Tukey-Kramer.....	38

Figura 13. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre filos bacterianos menos abundantes presentes no solo de cerrado sentido restrito submetidos à adição de nutrientes por meio do programa STAMP utilizando o teste ANOVA -Tukey-Kramer.....	39
Figura 14. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as estações chuvosa (azul) e seca (marrom) entre filos bacterianos mais abundantes presentes no solo de cerrado sentido restrito submetidos à adição de nutrientes por meio do programa STAMP utilizando o teste ANOVA -Tukey-Kramer.....	40
Figura 15. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as estações chuvosa (azul) e seca (marrom) entre filos bacterianos mais abundantes presentes no solo de cerrado sentido restrito submetidos à adição de nutrientes por meio do programa STAMP utilizando o teste ANOVA -Tukey-Kramer.....	41
Figura 16. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as estações chuvosa (azul) e seca (marrom) entre filos bacterianos menos abundantes presentes no solo de cerrado sentido restrito submetidos à adição de nutrientes por meio do programa STAMP utilizando o teste ANOVA -Tukey-Kramer.....	42
Figura 17. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) <i>unweighted</i> (A) e (B) <i>weighted</i> das sequências 16S rDNA do solo de áreas de cerrado sentido restrito submetidos à adição de nutrientes.....	43
Figura 18. Análise dos componentes principais (PCA) com os filos abundantes dos solos analisados.....	44
Figura 19. Experimento conduzido em casa de vegetação com plantas envasadas das espécies <i>Echinolaena inflexa</i> (nativa) e <i>Melinis minutiflora</i> (invasora).....	66
Figura 20. Dendrograma baseado nos perfis das comunidades bacterianas do solo rizosférico de <i>E. inflexa</i> e <i>M. minutiflora</i> , nas estações seca (agosto 2009) e chuvosa (dezembro 2009).....	73
Figura 21. Dendrograma baseado nos perfis das comunidades bacterianas do solo rizosférico de <i>E. inflexa</i> e <i>M. minutiflora</i> , nas estações seca (agosto 2009) e chuvosa (dezembro 2009).....	74
Figura 22. Dendrograma baseado nos perfis das comunidades bacterianas do solo rizosférico de <i>E. inflexa</i> e <i>M. minutiflora</i> , nas estações seca (agosto 2009) e chuvosa (dezembro 2009).....	75
Figura 23. Dendrograma baseado nos perfis das comunidades bacterianas do solo rizosférico de <i>E. inflexa</i> , <i>M. minutiflora</i> e interação <i>E. inflexa</i> + <i>M. minutiflora</i> no tempo inicial (Ti), do experimento com plantas envasadas em casa de vegetação.....	80
Figura 24. Dendrograma baseado nos perfis das comunidades bacterianas do solo rizosférico de <i>E. inflexa</i> , <i>M. minutiflora</i> e interação <i>E. inflexa</i> + <i>M. minutiflora</i> no tempo final (Tf), do experimento com plantas envasadas em casa de vegetação.....	81

Figura 25. Dendrograma baseado nos perfis das comunidades bacterianas do solo dos vasos sem gramíneas nos tempos inicial e final (Ti e Tf), do experimento com plantas envasadas em casa de vegetação.....	82
Figura 26. Dendrograma baseado nos perfis das comunidades bacterianas do solo rizosférico de <i>E. inflexa</i> nos tempos inicial e final (Ti e Tf), do experimento com plantas envasadas em casa de vegetação.....	83
Figura 27. Dendrograma baseado nos perfis das comunidades bacterianas do solo rizosférico da interação <i>E. inflexa</i> + <i>M. minutiflora</i> nos tempos inicial e final (Ti e Tf), do experimento com plantas envasadas em casa de vegetação. ....	84
Figura 28. Dendrograma baseado nos perfis das comunidades bacterianas do solo rizosférico de <i>M. minutiflora</i> nos tempos inicial e final (Ti e Tf), do experimento com plantas envasadas em casa de vegetação.....	85
Figura 29. Comprimento total de raízes (CTR) (A), comprimento de raízes finas (CRF) (B), projeção de área total (PAT) (C) e superfície total de raízes (D) para os vasos de <i>E. inflexa</i> , <i>M. minutiflora</i> crescidos em monocultura e em interação. ....	87
Figura 30. Biomassa de raízes (A), relação comprimento de raízes finas/comprimento total (B) e relação comprimento/biomassa de raiz (C) de <i>E. inflexa</i> e <i>M. minutiflora</i> crescidos em monocultura e em interação.....	88
Figura 31. Comprimento parte aérea (A), relação comprimento de raízes /comprimento parte aérea (B) de <i>E. inflexa</i> e <i>M. minutiflora</i> crescidos em monocultura e em interação.....	89
Figura 32. Distribuição da precipitação mensal (mm) durante o período de janeiro de 2010 a dezembro de 2010.....	104
Figura 33. Fotos das áreas fazenda Jéssica, em Paracatu, Minas Gerais. (A) Área de cerrado sentido restrito; (B) Área de pastagem em uso; (C) Área de pastagem com plantio de arbóreas.....	106
Figura 34. Esquema referente às coletas de solo realizadas em Paracatu, Minas Gerais.....	109
Figura 35 Valores médios do teor de umidade no solo (%), pH em água e CaCl <sub>2</sub> obtidos em áreas de cerrado sentido restrito, pastagem em uso e pastagem com arbóreas, no intervalo de 0 a 10 cm de profundidade do solo.....	114
Figura 36. Concentrações de P (mg/dm <sup>3</sup> ) (A) e K (mg/dm <sup>3</sup> ) (B) disponíveis no solo para as áreas de cerrado sentido restrito, pastagem em uso e pastagem com arbóreas.....	115
Figura 37. Concentrações de Ca (mg/dm <sup>3</sup> ) (A) e Mg (mg/dm <sup>3</sup> ) (B) disponíveis no solo para as áreas de cerrado sentido restrito, pastagem em uso e pastagem com arbóreas.....	116

Figura 38. Concentrações de Al (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> ) (A), CTC (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> ) (B) e MO (dag/kg) (C) disponíveis no solo para as áreas de cerrado sentido restrito, pastagem em uso e pastagem com arbóreas.....	117
Figura 39. Análise dos componentes principais (PCA) dos parâmetros químicos dos solos analisados (A); Análise dos componentes principais (PCA) dos filos dominantes dos solos analisados (B).....	118
Figura 40. Frequência dos filos dominantes (> 1%) de acordo com as análises de pirosequenciamento.....	122
Figura 41. Frequência dos filos menos dominantes (< 1%) de acordo com as análises de pirosequenciamento.....	123
Figura 42. Diferenças significativas (p < 0,05) entre os filos bacterianos mais abundantes das áreas de cerrado sentido restrito, pastagem em uso e pastagem com arbóreas, por meio do programa STAMP utilizando o teste ANOVA Tukey-Kramer.....	124
Figura 43. Diferenças significativas (p < 0,05) entre os filos bacterianos menos abundantes das áreas de cerrado sentido restrito, pastagem em uso e pastagem com arbóreas, por meio do programa STAMP utilizando o teste ANOVA Tukey-Kramer.....	125
Figura 44. Diferenças significativas (p < 0,05) entre as estações chuvosa (azul) e seca (marrom) dos filos bacterianos mais abundantes presentes no solo de cerrado sentido restrito, pastagem em uso e pastagem com arbóreas, por meio do programa STAMP utilizando o teste ANOVA Tukey-Kramer.....	126
Figura 45. Diferenças significativas (p < 0,05) entre as estações chuvosa (azul) e seca (marrom) dos filos bacterianos menos abundantes presentes no solo de cerrado sentido restrito, pastagem em uso e pastagem com arbóreas, por meio do programa STAMP utilizando o teste ANOVA Tukey-Kramer.....	127
Figura 46. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) <i>weighted</i> (A) e <i>unweighted</i> (B) das sequências 16S rDNA do solo de áreas de cerrado sentido restrito, pastagem em uso e pastagem com arbóreas.....	128

## TABELAS

Tabela 1: Características físico-químicas dos solos da rizosfera de <i>E. inflexa</i> e <i>M. minutiflora</i> nos meses de agosto e dezembro de 2009 (estação seca e chuvosa, respectivamente) na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, DF.....	71
Tabela 2: Análise das propriedades físico-químicas dos solos dos vasos com <i>E. inflexa</i> , <i>M. minutiflora</i> , <i>E. inflexa</i> + <i>M. minutiflora</i> e solo.....	77
Tabela 3: Lista das espécies arbóreas utilizadas no plantio da área em recuperação da fazenda Jéssica, em Paracatu, Minas Gerais.....	107

## RESUMO GERAL

A composição e estrutura de comunidades bacterianas de solos de cerrado em áreas nativas submetidas à adição de nutrientes, invasão por espécies de gramíneas exóticas e em áreas convertidas a pastagens submetidas a plantio de espécies arbóreas foram avaliadas neste trabalho. No primeiro caso, amostras de solo foram coletadas em uma área de cerrado sentido restrito na Reserva Ecológica do IBGE (Brasília, DF, Brasil) onde foram estabelecidas 20 parcelas experimentais de 225m<sup>2</sup> (cinco por tratamento). Entre 1998 e 2006 foram aplicados 100 kg.ha.ano<sup>-1</sup> de N (tratamento N), 100 kg.ha.ano<sup>-1</sup> de P (tratamento P), 100 kg.ha.ano<sup>-1</sup> de N e P em combinação (tratamento NP) e 4 t.ha.ano<sup>-1</sup> de Ca (tratamento Ca). As parcelas fertilizadas foram comparadas com parcelas não fertilizadas (controle). As características químicas dos solos diferiram significativamente entre os tratamentos. As análises da comunidade bacteriana do solo foram realizadas através da técnica de pirosequenciamento. Observou-se diferenças entre as amostras dos tratamentos de adição de nutrientes e também entre amostras coletadas nas estações seca e chuvosa. Os filos mais abundantes (Acidobacteria, Proteobacteria, Planctomycetes e Verrumicrobia) foram os que apresentaram maiores diferenças entre os tratamentos com aumento ou decréscimo da abundância relativa de acordo com o tratamento. Entre os filos menos abundantes, maiores diferenças foram observadas para os filos Armatimonadetes e Elusimicrobia, também com aumento ou decréscimo da abundância relativa de acordo com o tratamento. Entre os filos mais abundantes, as diferenças entre estações foram maiores para Planctomycetes, Proteobacteria e Firmicutes enquanto para os filos menos abundantes, as diferenças foram mais marcantes para Armatimonadetes e Elusimicrobia, com aumento da abundância relativa. Os efeitos da invasão por espécie de gramínea exótica sobre a comunidade bacteriana do solo foram verificados através de coletas em situação de campo e através de experimento em casa de vegetação. Em campo foram realizadas coletas de solo rizosférico associado a indivíduos das gramíneas *Melinis minutiflora* (exótica) e *Echinolaena inflexa* (nativa). Observou-se maior concentração de nutrientes no solo rizosférico de *M. minutiflora* em relação a *E. inflexa*. A análise de géis de DGGE indicou diferenciação das comunidades bacterianas de solo entre as espécies, bem como diferenças relacionadas à sazonalidade. Os efeitos da interação entre as gramíneas foram analisados no experimento em vasos. A diferenciação da comunidade bacteriana do solo entre as espécies foi observada tanto em monocultura como nos vaso com interação das duas espécies. As áreas convertidas em pastagem e submetidas ao plantio de arbóreas localizam-se em uma fazenda particular no município de Paracatu, Minas Gerais. As coletas de solo foram realizadas em: 1. área de cerrado sentido restrito adjacente, 2. área de pastagem em uso e 3. área de pastagem com arbóreas. As análises da comunidade bacteriana do solo foram realizadas através da técnica de pirosequenciamento. As concentrações de nutrientes no solo diferiram entre as três áreas estudadas. Observou-se diferenças nas comunidades bacterianas do solo nas áreas de pastagem e a área de cerrado nativo, bem como os efeitos da sazonalidade. Os filos mais abundantes - Acidobacteria e Planctomycetes - foram os que apresentaram maiores diferenças entre os tratamentos e entre estações, aumentando sua abundância relativa. Entre os filos menos abundantes, o filo Armatimonadetes apresentou maior diferença, com aumento da abundância relativa. Os resultados indicam que alterações induzidas pela adição de nutrientes e invasão biológica em áreas nativas de Cerrado bem como a conversão em pastagens afeta a abundância e composição de comunidades bacterianas do solo e que essas respostas interagem com a sazonalidade da precipitação.

## GENERAL ABSTRACT

In this study we characterized the effects of nutrient addition, reforestation, invasion by exotic grass species, and conversion to pasture on the composition and structure of bacterial communities in Cerrado soils. To evaluate the effect of nutrient addition, 20 plots (five plots/treatment, 225 m<sup>2</sup> each) were established in a Cerrado sentido restrito area of Reserva Ecológica do IBGE (Brasília, DF, Brasil). From 1998 to 2006 the plots were treated with: 1) ammonium sulfate (N treatment, 100 kg ha<sup>-1</sup> year<sup>-1</sup>), 2) single superphosphate (P treatment, 100 kg ha<sup>-1</sup> year<sup>-1</sup>), 3) ammonium sulfate and single superphosphate (N/P treatment, each 100 kg ha<sup>-1</sup> year<sup>-1</sup>), 4) limestone and gypsum (Ca treatment, 4 t ha<sup>-1</sup> year<sup>-1</sup>), or 5) left untreated (control). Pyrosequencing results showed that bacterial communities differed significantly between fertilized and unfertilized soils and between samples collected in wet and dry seasons. The most abundant phyla (Acidobacteria, Proteobacteria, Planctomycetes, and Verrucomicrobia) showed the greatest differences overall with increased or decreased in relative abundance depending on the treatment. Among less abundant phyla, Armatimonadetes and Elusimicrobia showed the greatest differences also with increased or decreased in relative abundance depending on the treatment. Effects of seasonality were most pronounced in Planctomycetes, Proteobacteria, and Firmicutes (among the most abundant phyla) and in Armatimonadetes and Elusimicrobia with increased relative abundance (among the least abundant phyla). Effects of exotic grass invasion were evaluated in a greenhouse experiment and in the field by analyzing rhizosphere soil associated with *Melinis minutiflora* (exotic) and *Echinolaena inflexa* (native). We found that nutrient concentrations were higher in the rhizosphere of *M. minutiflora* than in that of *E. inflexa*. In addition, denaturing gradient gel electrophoresis analysis revealed that bacterial communities differed significantly between rhizospheres of the two species and between soil samples collected in wet and dry seasons. Interactions between grass species were evaluated in a pot experiment in which the two species were grown either together or separately. The results revealed that each grass species was associated with a distinct bacterial community under both conditions. The effects of conversion to pasture and reforestation were evaluated at a private farm near the city of Paracatu, Minas Gerais. Soil samples were collected in: 1) a Cerrado sentido restrito area, 2) a pasture that was in use, and 3) a pasture planted with tree species. We found that nutrient concentrations differed among the three soil areas. In addition, pyrosequencing analysis revealed that bacterial communities differed among soil areas and between wet and dry seasons. The most abundant phyla (Acidobacteria and Planctomycetes) showed the greatest differences overall; among the less abundant phyla, Armatimonadetes showed the greatest differences. The results indicate that changes induced by the addition of nutrients and biological invasion in native Cerrado areas as well as the conversion into grassland affects the abundance and composition of soil bacterial communities and that these responses interact with the precipitation and seasonality.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil possui a maior biodiversidade do planeta, sendo considerado o mais rico entre os países detentores de megadiversidade (MMA, 1998). O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, ocupando aproximadamente, 1,8 milhões km<sup>2</sup> e compreende um gradiente de fitofisionomias campestres, savânicas e florestais que dominam o Centro-Oeste brasileiro (SANO & ALMEIDA, 2008). É considerado um dos hotspots mundiais de biodiversidade em função de sua riqueza de espécies, alto nível de endemismos e perda de habitats (MYERS *et al.*, 2000).

A conversão de áreas nativas de Cerrado em agrícolas tem aumentado significativamente nos últimos 40 anos. Estima-se que mais da metade dos 2 milhões de quilômetros quadrados, originalmente ocupados por vegetação de Cerrado, tenha sido transformada em pastagens, campos de cultivo, assentamentos urbanos e áreas degradadas. Considerando a área original de 204 milhões de hectares, o bioma já perdeu 47,84% de sua cobertura de vegetação até 2008. Avaliada pelo Projeto de Monitoramento do Desmatamento nos Biomas Brasileiros por Satélite (projeto de cooperação técnica entre o Ministério do Meio Ambiente - MMA, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA e o Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento - PNUD), a área desmatada até 2002 foi de 890.636 km<sup>2</sup>, e, entre 2002 e 2008, esse valor foi acrescido de 85.074 km<sup>2</sup>, o que equivale a valor médio anual de 14.179 km<sup>2</sup> (CRS/IBAMA, 2009).

O uso da terra tem se caracterizado pelos sistemas de produção intensiva, com mecanização e utilização de elevadas doses de fertilizantes e pesticidas. A melhoria de aptidão agrícola do Cerrado não se limitou às estratégias de correção química do solo, mas também ao desenvolvimento e lançamento de novas variedades agrícolas, como por exemplo, a soja, (REZENDE, 2002).

A busca de práticas agrícolas que proporcionem altas produtividades com sustentabilidade dos agroecossistemas tem sido um grande desafio. O conhecimento sobre o funcionamento biológico do solo do bioma Cerrado ainda é escasso, sendo uma necessidade a busca de bioindicadores que avaliem de modo eficaz, as alterações que ocorrem no solo e seus impactos sobre a composição e funcionamento da microbiota, indicando estratégias adequadas de conservação e manejo. (MENDES *et al.*, 2012).

Comunidades microbianas estão diretamente envolvidas nos ciclos biogeoquímicos, entretanto nosso conhecimento sobre as mudanças em sua composição, diversidade e funcionalidade em regiões tropicais é ainda limitado.

O manejo do solo para cultivo altera a cobertura vegetal e as propriedades físicas, químicas e biológicas, agindo diretamente sobre as comunidades microbianas. As alterações são refletidas na composição, atividade e biomassa da comunidade microbiana, pois sua permanência no ecossistema fica condicionada à sua habilidade de adaptação e resposta a essas mudanças ambientais (PEREIRA *et al.*, 1999).

Recentemente têm se abordado os efeitos dessas alterações na estrutura e funcionamento das comunidades microbianas dos solos de cerrado (PEIXOTO *et al.*, 2002; PINTO *et al.*, 2006; QUIRINO *et al.*, 2009; BRESOLIN *et al.*, 2010; CASTRO *et al.*, 2011; ARAÚJO *et al.*, 2012; MENDES *et al.*, 2012).

Os microrganismos vêm evoluindo há aproximadamente 4 bilhões de anos, e até 2 bilhões de anos atrás eram a única forma de vida na Terra (WARD, 1998). Em virtude da sua longa história evolutiva e da necessidade de adaptação aos mais distintos ambientes, os microrganismos acumularam uma impressionante diversidade genética (WARD, 1998). Os microrganismos representam o repertório mais rico em diversidade química e molecular na natureza, constituindo a base de processos ecológicos, além de manterem relações vitais entre si e com os organismos superiores (HUNTER-CEVERA, 1998). Entretanto, a diversidade de microrganismos é tão grande quanto desconhecida. Os estudos microbiológicos continuam descobrindo níveis inesperados de diversidade microbiana em ambientes incomuns, como biofilmes em chuviros (FEAZEL *et al.*, 2009), na troposfera (BOWERS *et al.*, 2009) e dentro de rochas provenientes da Antártica (CARY *et al.*, 2010). Um grama de solo pode conter 10 bilhões de microrganismos, representando milhares de espécies (ROSSELÓ- MORA & AMANN, 2001). A principal razão para nosso pouco conhecimento é que, até pouco tempo atrás, os microrganismos tinham que ser cultivados para serem identificados (PACE, 1996) e, além disso, o tamanho microscópico dos microrganismos, a frequência de ocorrência das populações, a sazonalidade, e em muitos casos, a dependência de hospedeiros e/ou substratos específicos para sua sobrevivência e multiplicação também eram importantes limitações (TORSVIK & ØVREÅS, 2002). Hoje em dia, com o aperfeiçoamento de técnicas moleculares e com a redução de custos de análises, isto não é mais um fator limitante.



Nos ecossistemas naturais, a cobertura vegetal permanente proporciona proteção contínua do solo, além de adicionar nutrientes e matéria orgânica, principalmente através de seus resíduos. Seus efeitos sobre a comunidade microbiana podem interagir com os efeitos provocados pelas flutuações hídricas e térmicas que ocorrem durante o ano, influenciando em menor ou maior grau as comunidades microbianas, através da determinação da atividade e das taxas de crescimento das diversas populações na comunidade microbiana. Em agroecossistemas, o preparo e o cultivo do solo influenciam a comunidade microbiana, principalmente através de alterações na aeração e na disponibilidade de nutrientes do solo.

Em um agroecossistema, a variação da diversidade microbiana ao longo das estações do ano ainda não é bem compreendida, já que em cada estação parece ocorrer uma comunidade microbiana dominante acompanhada de outras pouco abundantes que, muitas vezes, estão abaixo do nível de detecção dos métodos de avaliação (TORSVIK & ØVREÅS, 2002). Tais variações estão diretamente ligadas ao regime hídrico e ao clima da região, à estrutura e ao manejo do solo, e ao teor e à qualidade dos resíduos vegetais aportados (TIEDJE *et al.*, 2001). Um solo com teor elevado de matéria orgânica tende a manter a população microbiana mais estável ao longo do ano, provavelmente, em decorrência da riqueza de nichos ecológicos, pela heterogeneidade das fontes de carbono (GRAYSTON *et al.*, 2001).

A calagem e a adubação são alternativas técnicas utilizadas para corrigir a elevada acidez e a baixa fertilidade dos solos do Cerrado. Entretanto, as alterações do pH e da disponibilidade de nutrientes podem influenciar a comunidade microbiana de maneira direta através da atuação sobre processos microbianos, fisiológicos e bioquímicos específicos, ou indiretamente através da disponibilidade de nutrientes e da neutralização de elementos tóxicos (KAMEL *et al.*, 1989). Mudanças causadas pelo homem no ciclo do N são particularmente importantes devido ao fato de que adição de N altera substancialmente a composição, a produtividade e outras propriedades do ecossistema (VITOUSEK *et al.*, 1997). A disponibilidade de nitrogênio (N), para produtores primários parece ser particularmente sensível à composição da comunidade de plantas.

O aumento dos níveis de deposição de nitrogênio, associado à indústria e a agricultura, pode conduzir os solos em direção a um nível tóxico de acidificação, de redução do crescimento das plantas, além de poluir as águas superficiais. Este aumento tem o potencial de afetar diretamente os microrganismos do solo, pois altera a

interações competitivas entre as plantas. Os efeitos no nitrogênio nos microrganismos do solo podem se manifestar de maneira indireta, em particular, no caso dos fungos, onde estaria alterando a relação simbiótica com raízes de plantas (BRADLEY *et al.*, 2006). Estudos têm mostrado que a natureza e a quantidade de fertilizantes usados afetam a atividade enzimática microbiana, principalmente envolvendo as enzimas degradadoras de lignina e modificam a composição microbiana do solo (BARDGETT *et al.*, 1999, PEIXOTO *et al.*, 2010).

As mudanças ocorridas nos ecossistemas sejam para o manejo do solo para cultivo ou através das mudanças ambientais globais, facilitam a entrada de espécies vegetais com alto poder de colonização, conhecidas como espécies invasoras. Estas espécies possuem a característica de alterar as funções do ecossistema.

O rápido avanço das espécies invasoras torna a invasão biológica, juntamente com as mudanças antrópicas nas paisagens naturais e as alterações na atmosfera, os maiores agentes das mudanças globais (MACK *et al.*, 2000). O estabelecimento, naturalização e expansão das espécies invasoras são responsáveis por grandes mudanças na composição das espécies, estrutura das comunidades e nas principais funções dos ecossistemas naturais (MACDONALD, 1988; VITOUSEK *et al.*, 1997; D'ANTONIO & MEYERSON, 2002).

A invasão por espécies exóticas sejam animais ou vegetais, representam um grave problema para o funcionamento dos ecossistemas naturais e ameaça a manutenção da diversidade biológica (BOSSARD *et al.* 2000). Os efeitos da invasão biológica podem ser classificados em três níveis: 1- indivíduo (ex: redução do crescimento ou reprodução); 2- tamanho da população, estrutura, composição genética (ex: extinção), e 3- composição da comunidade e estrutura, e processos do ecossistema (ex: ciclagem de nutrientes) (BYERS *et al.*, 2002).

No território brasileiro, a introdução das gramíneas de origem africana *Andropogon gayanus* Kunth, *Brachiaria decumbens* Staf *Hyparrhenia rufa* (Ness) Stapf. e *Melinis minutiflora* (capim gordura) ocorreu acidentalmente, ou para fins comerciais, e essas gramíneas se espalharam por grandes extensões de ecossistemas naturais deslocando espécies nativas graças a sua agressividade e o grande poder competitivo (EITEN & GOODLAND, 1979).

O capim-gordura (*Melinis minutiflora*) é uma invasora extremamente agressiva que compete com sucesso com a flora nativa. É capaz de invadir áreas naturais e de descaracterizar em poucos anos a fisionomia da vegetação original (FILGUEIRAS,

1990). Na região do Cerrado, o capim-gordura é uma das principais espécies invasoras e, devido ao seu potencial adaptativo, tem se tornado um grande problema em Unidades de Conservação (PIVELLO *et al.*, 1999a; 1999b).

A região do Cerrado foi marcada por grandes investimentos para formação de pastagens plantadas na década de 70 (EITEN & GOODLAND, 1979; ANDRADE, 1986). Neste período, iniciou-se um programa de substituição do capim-gordura por gramíneas mais produtivas, principalmente as espécies do gênero *Brachiaria* (*B. decumbens*, *B. humidicola*, *B. brizantha*).

A abertura de novas áreas para agricultura e o abandono de áreas degradadas estaria favorecendo o estabelecimento de espécies vegetais invasoras na região do Cerrado. Pesquisas mostram que 70% das pastagens brasileiras estão em processo de degradação, principalmente no cerrado, áreas de transição e na Amazônia, o que afeta a produtividade e a sustentabilidade da pecuária nacional. As estimativas para o Brasil chegam em 70 milhões de hectares de pastagens degradadas (FAO 2008). O desenvolvimento de tecnologias para recuperar áreas de pastagens abandonadas e degradadas, tais como o uso de sistemas agroflorestais, serve como alternativa para minimizar a pressão de desmatamento sobre novas áreas, e proporcionar desenvolvimento social, econômica e ecologicamente sustentável para os agricultores (DIAS-FILHO, 2006).

Em 2003, os imóveis rurais no Brasil ocupavam 49,1% da área terrestre total do país, com o Centro-Oeste (principalmente Cerrado) representando a maior proporção (32% da área total do país), e com a maior área média de propriedades rurais em todo o país (397,2 ha). O número de propriedades rurais foi estimado em 1.032 milhões nos 11 estados do Cerrado, com cerca de 795 mil de agricultores familiares. A atividade agrícola deverá continuar aumentando na região do Cerrado por algum tempo, dado que ainda possui áreas muito grandes com potencial agrícola e florestal. Essas áreas tendem a se tornar gradualmente mais acessíveis e, portanto, mais atraentes para o investimento. Esse panorama ressalta a importância da participação do setor privado e proprietários rurais em estratégias de conservação para o Cerrado.

Segundo o Código Florestal Brasileiro (art. 12), imóveis rurais devem manter área com cobertura de vegetação nativa, a título de Reserva Legal, sem prejuízo da aplicação das normas sobre as Áreas de Preservação Permanente, com a função de assegurar o uso econômico de modo sustentável dos recursos naturais do imóvel rural, auxiliar a conservação e a reabilitação dos processos ecológicos e promover a

conservação da biodiversidade, bem como o abrigo e a proteção da fauna silvestre e da flora nativa. Para imóveis situados em área de Cerrado, a faixa de preservação deve ser de 20% da área total da propriedade (35% em área de transição com a Amazônia). Entretanto, na grande maioria das propriedades a utilização inadequada de áreas de Reserva Legal torna a recuperação dessas áreas um importante fator na reabilitação de processos ecológicos e da biodiversidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, R.P. 1986. Pastagens na região dos Cerrados. *Anais do 8º Simpósio sobre manejo de pastagens*: FEALQ, p. 455-479.
- ARAÚJO, J.F.; CASTRO, A. P.; COSTA, M.M.C.; TOGAWA, R.C.; PAPPAS, G.J.; QUIRINO, B.F.; BUSTAMANTE, M.M.C.; WILLIAMSON, L.; HANDELSMAN, J.; KRÜGER, R. H. 2012. Characterization of soil bacterial assemblies in Brazilian savanna-like vegetation reveals Acidobacteria dominance. *Microbial Ecology* 64 [3]:760-770.
- BARDGETT, R.D.; SHINE, A. Linkages between plant litter diversity, soil microbial biomass and ecosystem function in temperate grasslands. 1999. *Soil Biology and Biochemistry* (31): 317-321.
- BOSSARD, C.C.; RANDALL, J.M.; HOSHOVSKY, M. 2000. Invasive plants of California's wildlands. University of California Press, Berkeley, California, USA. 360p.
- BRADLEY, K.; DRIJBER, R.A.; KNOPS, J. 2006. Increased N availability in grassland soils modifies their microbial communities and decreases the abundance of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry* (38): 1583-1595.
- BRESOLIN, J.D.; BUSTAMANTE, M.M.C.; KRÜGER, R.H.; SILVA, M.R.S.S.; PEREZ, K.S. 2010. Structure and composition of bacterial and fungal community in soil under soybean monoculture in the Brazilian Cerrado. *Brazilian Journal of Microbiology* 41:391-403.
- BOWERS, R.; LAUBER, C.; WIEDINMYER, C.; HAMADY, M.; HALLAR, A.; FALL, R.; KNIGHT, R.; FIERER, N. 2009. Characterization of airborne microbial communities at a high elevation site and their potential to act as atmospheric ice nuclei. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 5121 ó 5130.
- BYERS, J.E.; REICHARD, S.; RANDALL, J.M.; PARKER, I.M.; SMITH, C.S.; LONSDALE, W.M. 2002. Directing research to reduce the impacts of nonindigenous species. *Conservation Biology* 16: 630ó640.
- CARY, S.C., MCDONALD, I.R., BARRETT, J.E., COWAN, D. A. 2010. On the rocks: the microbiology of Antarctic Dry Valley soils. *Nature Reviews Microbiology* 8 [2]: 129-138.
- CASTRO, A. P.; QUIRINO, B.F.; ALLEN, H.; WILLIAMSON, L.L.; HANDELSMAN, J.; KRÜGER, R. K. 2011. Construction and validation of two metagenomic DNA libraries from Cerrado soil with clay content. *Biotechnology Letters* 33 [11]: 2169-2175.
- CÓDIGO FLORESTAL - Lei 12.651/2012 (Lei Ordinária) 25/05/2012 (www.planalto.gov.br).
- CRS/IBAMA. 2009. Relatório técnico de monitoramento do desmatamento no bioma Cerrado, 2002 a 2008: dados revisados. Acordo de cooperação técnica MMA/IBAMA/PNUD. 69p.
- D'ANTONIO, C.M.; MEYERSON, L.A. 2002 Exotic plant species as problems and solutions in ecological restoration: a synthesis. *Restoration Ecology* 10 [4]: 703-713.

- DIAS-FILHO, M.B. 2006. Sistemas silvipastoris na recuperação de pastagens degradadas . Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 30p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 258). Disponível em: <http://www.embrapa.cpatu.br/documentos>. Acesso em: 18 de março de 2011.
- EITEN, J.; GOODLAND, R. 1979. Ecology and management of semi-arid ecosystems in Brazil. Reprinted from Management of semi-arid Ecosystems, B.H. Walker (ed.), Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.
- FAO <http://www.ric.fao.org/pr/comisiones/codegalac> 2008.
- FEAZEL, L.M.; BAUMGARTNER, L.K.; PETERSON, K.L.; FRANK, D.N.; HARRIS, J.K.; PACE, N.R. 2009. Opportunistic pathogens enriched in showerhead biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 106: 16393 ó 16398.
- FILGUEIRAS, T.S. 1990. Africanas no Brasil. Gramíneas introduzidas da África. *Cadernos de Geociências* 5: 57-63.
- GRAYSTON, S.J.; JONES, D.V.D. 2001. Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with an annual plant: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Applied Soil Ecology* 5 [1]: 29-56.
- KAMEL, Z.; KHALIL, M.S.; SHALABY, A.M. 1989. Calcium and biological activities of two Streptomyces species isolated, from the rhizosphere of soybean plants. *Journal of Basic Microbiology* 29 [1]: 31-39.
- HUNTER-CEVERA, J.C. 1998. The value of microbial diversity. *Current Opinion in Microbiology*, Amsterdam, v. 1, n. 3, p. 278-285.
- MACDONALD, I.A.W. 1988. The Invasion of introduced species into nature reserves in tropical savannas and dry woodlands. *Biological Conservation* (44): 67-93.
- MACK, R.N.; SIMBERLOFF, D.; LONSDALE, W.M.; EVANS, H.; CLOUT, M.; BAZZAZ, F. 2000. Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and control. *Ecological Applications* 10: 689-710.
- MENDES, I.C.; FERNANDES, F.M.; CHAER, G.M.; REIS JUNIOR, F.B. 2012. Biological functioning of Brazilian Cerrado soils under different vegetation types. *Plant and Soil* 352: 183-195.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- MMA (Ministério do Meio Ambiente). 1998. Primeiro relatório nacional para a Conservação sobre Diversidade Biológica. Ministério do Meio Ambiente (MMA), Brasília.
- PACE, N. R. 1996. News perspectives on the naturam microbial world: molecular microbial ecology. *ASM News* 62 [9]: 463-470.
- PEIXOTO, R.S.; COUTINHO, H.L.C.; RUMJANEK, A.M.; ROSADO, A.S. 2002. Use of *rpoB* and 16S rDNA genes to analyze bacteria diversity of a tropical soil using PCR and DGGE. *Letters in Applied Microbiology* 35: 316-320.
- PEIXOTO, R.S.; CHAER, G.M.; FRANCO, N.; REIS JUNIOR, F.B.; MENDES, I.C.; ROSADO, A.S. 2010. A decade of land use contributes to changes in the chemistry, biochemistry and bacterial community structures of soils in the Cerrado. *Antonie van Leeuwenhoek* 98:4036413.
- PEREIRA, J.C.; NEVES, M.C.P.; DROZDOWICZ, A. 1999. Influência da antibiose exercida por actinomicetos às estirpes de *Bradyrhizobium* spp. na nodulação da soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34 [1]: 99-108.

- PINTO, A.S.; BUSTAMANTE, M.M.C.; SILVA, M.R.S.S.; KISSELLE, K.W.; BROSSARD, M.; KRÜGER, R.H.; ZEPP, R.; BURKE, R.A. 2006. Effects of Different treatments of Pasture Restoration on Soil Trace Gas Emissions in the Cerrados of Central Brazil. *Earth Interactions* 10: 1-26.
- PIVELLO, V.R.; CARVALHO, V.M.C.; LOPES, P.F.; PECCININI, A.A.; ROSO, S. 1999a. Abundance and distribution of native and alien grasses in a *õcerradoõ* (Brazilian savanna) biological reserve. *Biotropica* 31 [1]: 71-82.
- PIVELLO, V.R.; SHIDA, C.N.; MEIRELLES, S.T. 1999b. Alien grasses in Brazilian savannas: a treat to the biodiversity. *Biodiversity and Conservation* 8 [9]: 1281-1294.
- QUIRINO, B.F.; PAPPAS, G.J.; TAGLIAFERRO, A.C.; COLLEVATTI, R.G.; NETO, E.L.; DA SILVA, M.R.; BUSTAMANTE, M.M.; KRÜGER, R.H. 2009. Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with soil of the savanna-like Cerrado vegetation. *Microbiology Research* 164:59-70.
- REZENDE, G.C. 2002. Ocupação agrícola e estrutura agrária no cerrado: o papel do preço da terra, dos recursos naturais e da tecnologia. Rio de Janeiro, IPEA, out. 2002, 23p. (Texto para discussão n. 913).
- ROSSELÓ-MORA, R.; AMANN, R. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Review* 25 [1]: 39-67.
- SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P. de (Ed.).2008. *Cerrado: ambiente e flora*. Planaltina, DF: Embrapa-CPAC, volume 1. 512p.
- TIEDJE, J.M.; CHO, J.C.; MURRAY, A.; TREVES, D.; XIA, B.; AHOU, J. 2001. Soil teeming with life: new frontiers for soil science. In: Rees, R. M.; Ball, B. C.; Campebell, C. D.; Watson, C. A. (Org.). Sustainable management of soil organic matter. Wallingford: *CAB International*, p. 393-412.
- TORSVIK, V.; ØVREAS, L. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, Amsterdam, v. 5, n. 3, p. 240-245.
- VITOUSEK, P.M.; MOONEY, H.A.; LUBCHENCO, J.; MELILO, J.M. 1997. Human domination of Earth's Ecosystem. *Science* 227: 494-499.
- WARD, D.M. 1998. A natural species concept for prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology*. 1 [3]: 271-277.

## **2. OBJETIVO GERAL E ESTRUTURA DA TESE**

Em face dos aspectos acima apresentados, o objetivo geral da presente tese é avaliar os efeitos de alterações em ecossistemas de Cerrado sobre a diversidade bacteriana do solo. Os resultados são apresentados em três capítulos, estruturados da seguinte forma:

Capítulo 1 - Diversidade microbiana do solo em parcelas de cerrado sentido restrito submetidas à adição de nutrientes

Capítulo 2 ó Efeitos da invasão por gramíneas exóticas sobre as comunidades microbianas do solo

Capítulo 3 ó Efeitos do plantio de arbóreas em uma pastagem sobre a comunidade bacteriana do solo



## CAPÍTULO 1

### DIVERSIDADE BACTERIANA DO SOLO EM PARCELAS DE CERRADO SENTIDO RESTRITO SUBMETIDAS À ADIÇÃO DE NUTRIENTES

#### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de longa-duração de acréscimo de nutrientes e do efeito da sazonalidade da precipitação na comunidade bacteriana do solo em uma área de cerrado sentido restrito, localizada na Reserva Ecológica do IBGE RECOR/ IBGE). Cinco tratamentos foram comparados quanto à adição de nutrientes: controle (sem acréscimo de nutrientes), cálcio (Ca), nitrogênio (N), nitrogênio e fósforo (NP) e fósforo (P). Nós examinamos como a estrutura da comunidade bacteriana muda através da adição de nutrientes e se essas mudanças são semelhantes em parcelas de tratamentos diferentes e em diferentes estações do ano (seca e chuvosa). A composição da comunidade microbiana foi determinada pela técnica de pirosequenciamento do gene 16S rDNA, com *primers* específicos para bactérias. A comunidade bacteriana foi significativamente afetada pela adição de nutrientes, especialmente quando Ca foi adicionado. A sazonalidade foi outro fator de diferenciação entre as comunidades dos tratamentos. Um total de 18 filos foi identificado nos cinco tratamentos. Dez filos (AD3, Acidobacteria, Actinobacteria, Bacterioidetes, Chloroflexi, Firmicutes, Planctomycetes, Proteobacteria, Verrumicrobia e WPS-2) foram considerados abundantes com frequência de sequências maior que 1% e sete filos foram considerados em menor abundância, com frequência de sequências inferior a 1% (Armatimonadetes, Chlamydiae, Elusimicrobia, Gemmatimonadetes, BRC1, TM6, TM7). Acidobacteria, o grupo de bactérias não classificadas e o filo Proteobacteria, foram os mais abundantes nos cinco tratamentos, enquanto que o filo Acidobacteria foi o mais abundante nas duas estações. Sequências correspondentes a dois grupos do filo Acidobacteria (Chloroacidobacteria e Solibacteres) e um grupo representativo de não classificadas também foi identificado nas parcelas controle. Mudanças na comunidade bacteriana em resposta ao tratamento de adição de nutrientes foram relatadas pela presença/ausência de alguns grupos e pelas mudanças na abundância dos grupos comuns.

## ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the long-term effects of nutrient additions and seasonality of rainfall on the soil bacterial community of a Brazilian savanna. Five treatments were compared: control (without nutrient additions), calcium only (Ca), nitrogen only (N), nitrogen and phosphorus (NP) and phosphorus only (P) additions. We examined how the soil bacterial community structure changes with the addition of nutrients, whether these changes are similar across plots from different treatments and in different seasons (wet and dry). Microbial community composition was determined by barcoded pyrosequencing of the 16S rDNA gene employing a primer set that captures bacteria. The bacterial community was significantly affected by nutrient additions especially when Ca was added. Seasonality was another factor to differentiate bacterial communities in all treatments. A total of 18 phyla were identified in the five treatments. Ten phyla (AD3, Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Firmicutes, Planctomycetes, Proteobacteria, Verrucomicrobia and WPS-2) were considered abundant with sequence frequencies above 1% and seven phyla were considered low abundance with sequence frequencies below 1% (Armatimonadetes, Chlamydiae, Elusimicrobia, Gemmatimonadetes, BRC1, TM6 and TM7). Acidobacteria, the group of "*unclassified bacteria*" and phylum Proteobacteria, were the most abundant in the five treatments, whereas the phylum Acidobacteria was the most abundant in both seasons. Sequences corresponding to two groups of the phylum Acidobacteria (*Chloroacidobacteria* and *Solibacteres*) and a representative group *not classified* were also identified in the control plots. Changes in the bacterial community in response to the treatments were related to the presence/absence of certain groups and to changes in abundance of common groups.

## 1. INTRODUÇÃO

O uso da terra no Cerrado é caracterizado pela agricultura intensiva e mecanizada, utilizando grandes quantidades de fertilizantes e pesticidas. Em conjunto com a perda de habitats e com a mudança climática antrópica, a deposição atmosférica de nitrogênio (N) é um dos fatores determinantes da perda de biodiversidade em diferentes ecossistemas do mundo (BOBBKIN *et al.*, 2010). O aumento na deposição de N representa uma grande ameaça ecológica uma vez que a disponibilidade de nutrientes é fator chave na determinação da composição da comunidade vegetal. Adicionalmente, a estabilidade da vegetação em muitos ecossistemas, sobretudo na região tropical, é dependente principalmente da baixa fertilidade do solo. Um experimento de longa duração em uma área de cerrado nativo mostrou diminuição da diversidade de plantas lenhosas e herbáceas como resultado do aumento da disponibilidade de nutrientes com o favorecimento de algumas espécies (JACOBSON *et al.*, 2010 e BUSTAMANTE *et al.*, 2011, respectivamente). No mesmo experimento, foram observadas alterações das taxas de decomposição (JACOBSON *et al.*, 2010). No entanto, tais alterações na composição da comunidade vegetal e em processos biogeoquímicos no Cerrado ainda não foram associadas a alterações na diversidade bacteriana do solo.

A comunidade microbiana do solo é parte fundamental dos ciclos biogeoquímicos (PAUL & CLARK, 1996) e alterações na cobertura vegetal e manejo no solo podem afetar a atividade e a diversidade microbiana.

As modificações ambientais provocadas pela flutuação estacional das condições climáticas também podem influenciar as populações na comunidade microbiana (WARDLE & PARKINSON, 1990). Em ecossistemas naturais, a cobertura vegetal permanente proporciona proteção contínua do solo, além de adicionar matéria orgânica e nutrientes. Seus efeitos sobre a comunidade microbiana podem interagir com os efeitos provocados pelas flutuações hídricas e térmicas que ocorrem durante o ano, influenciando em menor ou maior grau as populações microbianas, através da determinação da atividade e das taxas de crescimento das diversas populações na comunidade microbiana (TSAI *et al.*, 1992).

Em sistemas cultivados, o preparo do solo influencia as populações da comunidade microbiana, principalmente através de alterações na estrutura (aeração) e química do solo (pH e disponibilidade de nutrientes). Alterações do pH podem influenciar a comunidade microbiana de maneira direta através da atuação sobre

processos microbianos, ou indiretamente através da disponibilidade de nutrientes (KAMEL *et al.*, 1989). O equilíbrio dinâmico das populações na comunidade microbiana do solo também pode sofrer modificações influenciadas pelas interações benéficas e/ou antagônicas dos microrganismos, determinando a composição qualitativa e quantitativa da comunidade (RAVERKAR & KONDE, 1988).

O aumento da disponibilidade de nutrientes afeta a qualidade e produtividade das plantas e os efeitos dos fertilizantes nos organismos do solo estão relacionados à qualidade e quantidade do material vegetal que entra no solo (DE VRIES *et al.*, 2006). Microrganismos têm mostrado menor diversidade funcional em pastagens manejadas fertilizadas com N. A entrada de fertilizantes torna-se um recurso prontamente disponível aos saprófitos primários, especialmente bactérias e para alguns nematóides oportunistas. Por outro lado a fertilização por nitrogênio por longos períodos alterou a comunidade fúngica de ectomicorrizas e aumentou a dominância da área por *Russula spp* (AVIS *et al.*, 2003)

Estudos anteriores conduzidos em áreas de Cerrado indicaram forte influência da sazonalidade da precipitação sobre as comunidades microbianas do solo (BRESOLIN *et al.*, 2010; VIANA *et al.*, 2011; MENDES *et al.*, 2012). A água é um componente indispensável para o desenvolvimento dos processos metabólicos no solo, com efeitos tantos físicos quanto químicos. Quando a água é abundante, torna mais fácil o transporte de nutrientes solúveis e o movimento de microrganismos móveis ou predadores; quando escassa, dificulta as trocas gasosas com a atmosfera externa e renovação do oxigênio. A inércia térmica da água também é um importante tampão contra os efeitos das altas temperaturas. A atividade microbiológica diminui com a restrição da água e alguns microrganismos são mais sensíveis do que outros. Segundo Robert & Schmit (1982), a atividade de grupos de bactérias é mais afetada que a de fungos. Bactérias Gram-negativas são mais sensíveis que as Gram-positivas devido a sua parede celular. Actinomicetos e cianobactérias são mais resistentes que a média dos microrganismos. Em geral, fixadoras de nitrogênio atmosférico são afetadas com pouca redução no conteúdo de água disponível.

A intensidade da mortalidade de microrganismos de solo com secas severas pode ser aumentada com a duração do período sem umidade e com a variação abrupta da temperatura. A taxa de sobrevivência dos microrganismos irá depender do estado fisiológico em que estes se encontram. Este efeito pode ser atenuado quando o solo é rico em húmus (DAVET, 2004). No entanto, em regiões semi-áridas, quando o solo é

regularmente submetido a intensas e prolongadas secas, a comunidade microbiana parece ter adquirido resistência e responde rapidamente à oferta de condições favoráveis (VAN GESTEL *et al.*, 1993).

A heterogeneidade temporal e espacial de recursos e da biota do solo são importantes fatores para compreender os efeitos dos pulsos de água nos ciclos biogeoquímicos de ecossistemas áridos e semiáridos (AUSTIN *et al.*, 2004). A distribuição descontínua da vegetação nesses ambientes resulta em ilhas de fertilidade tornando a distribuição de água e nutrientes desigual. Além da heterogeneidade espacial, a fauna do solo difere em suas respostas ao solo seco e aos pulsos de água, sugerindo que os pulsos de água disponíveis possam servir como um mecanismo de seleção nos ecossistemas áridos e semiáridos para organismos com alta resistência a oscilações entre úmido / seco. Experimentos em vaso indicaram, através da análise de fosfolipídeos, que as comunidades microbianas do solo são afetadas pela disponibilidade tanto de água quanto de carbono, mas mais à presença ou ausência de adições de carbono do que ao tipo de substrato (DRENOVSKY *et al.*, 2004). A razão entre fungos: bactéria também foi modificada quando a quantidade de água foi diminuída, em função da redução das populações de fungos.

Adicionalmente, interações entre plantas e microrganismos podem alterar respostas ao estresse hídrico. Marulanda *et al.* (2009) avaliaram experimentalmente a efetividade de bactérias na estimulação do crescimento de plantas e sua tolerância à seca. A tolerância das plantas de *Trifolium* à seca foi observada em plantas inoculadas por bactérias, onde estas estariam favorecendo a habilidade das plantas em aumentar seu conteúdo de água. O crescimento do sistema radicular de *Trifolium* seria favorecido pelo ácido indol acético (AIA) produzido pelas bactérias. Duas espécies de árvores mediterrâneas, *Pinus halepensis* e *Quercus coccifera*, inoculadas com *Pseudomonas fluorescens* apresentaram resposta à seca influenciada pela associação com microrganismos. Entretanto, a magnitude e o sinal das respostas dependeram da estratégia do uso de água por estas espécies (RINCÓN *et al.*, 2008).

Considerando as respostas anteriormente observadas da entrada de nutrientes sobre a diversidade de espécies lenhosas e herbáceas em uma área de cerrado, coloca-se a pergunta se a comunidade bacteriana de solo também é afetada em termos de diversidade e se o aumento da disponibilidade de nutrientes altera a sua resposta à seca sazonal. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo:

Descrever e comparar a diversidade da comunidade bacteriana dos solos em parcelas experimentais de cerrado sentido restrito submetido a diferentes tratamentos de adição de nutrientes bem como as interações entre as respostas aos tratamentos e à sazonalidade da precipitação.

As seguintes hipóteses foram formuladas:

1. A entrada de nutrientes via fertilização afeta a comunidade bacteriana de solo em área de cerrado nativo em função do aumento da disponibilidade de nutrientes no solo;
2. A sazonalidade bem marcada da precipitação no bioma Cerrado ocasiona mudanças nas comunidades microbianas de solo em função dos efeitos sobre as características químicas do solo.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Descrição da área de estudo

A área de estudo localiza-se na Reserva Ecológica do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (RECOR / IBGE) (Figura 1), localizada a 35 km ao sul do centro de Brasília, D. F., km 0 da BR 251 (15° 55' S, 47° 51' W), a uma altitude média de 1100 m, ocupando uma área de 1350 ha (Figura 1). O clima, segundo a classificação de Köppen, é tropical (Aw), com precipitação anual média entre 1100 a 1600 mm com duas estações bem definidas: seca e chuvosa. A estação seca ocorre de maio a setembro e a chuvosa de outubro a abril, quando ocorre mais de 90% da precipitação anual. As parcelas do estudo fazem parte do projeto "Estudo dos Efeitos das Mudanças Globais que Determinam a Estrutura e o Funcionamento de Ecossistemas de Cerrado" (IAI-PRONEX). O projeto foi implantado na RECOR desde 1998.

A vegetação da área de estudo é caracterizada como cerrado sentido restrito, formação fisionômica vegetal que caracteriza os cerrados do Brasil Central, ocupando aproximadamente 43% da região (EITEN, 1972). Já o solo da área é classificado como Latossolo Vermelho (distróficos, profundos e bem drenados e com minerais argilosos do tipo 1:1 com predomínio de óxidos de ferro e alumínio) (HARIDASAN, 1994).

### 2.2. Delineamento do experimento

O delineamento experimental foi o de blocos inteiramente casualizados onde as parcelas experimentais foram fertilizadas com nitrogênio, fósforo, cálcio e a combinação de nitrogênio com fósforo (Figura 2). Os tratamentos foram replicados quatro vezes em parcelas de 225 m<sup>2</sup> separadas por uma distância mínima de 10 m.

Os tratamentos foram divididos em controle (sem adubação), +N (adição de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), +P (adição de Ca (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> + CaSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O ó superfosfato simples 20%) e +NP (adição de sulfato de amônio e superfosfato simples 20%) aplicados no solo à lão, sobre a serapilheira, em quantidades iguais em sub-parcelas de 5x5 m, duas vezes ao ano (no início e final da estação chuvosa). Anualmente, entre 1998 e 2006, foram adicionados 100 kg de N, 100 kg de P e 100 kg de N + 100 kg de P por hectare. As calagens (tratamento Ca) foram realizadas através da adião de 60% de calcário dolomítico (CaO+MgO) + 40% de gesso agrícola (CaSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O) (4 t.ha.ano<sup>-1</sup>) uma vez

por ano no início da estação chuvosa, também aplicados no solo à lanço sobre a serapilheira. A aplicação em duas épocas teve a finalidade de propiciar uma menor perda dos nutrientes pelo sistema.

Ocorreram duas queimadas acidentais na área, a primeira em 1994, antes do início do projeto e a segunda em 2005, sete anos após o estabelecimento do estudo. A última aplicação de fertilizantes na área foi em abril de 2006, após a reinstalação das parcelas.



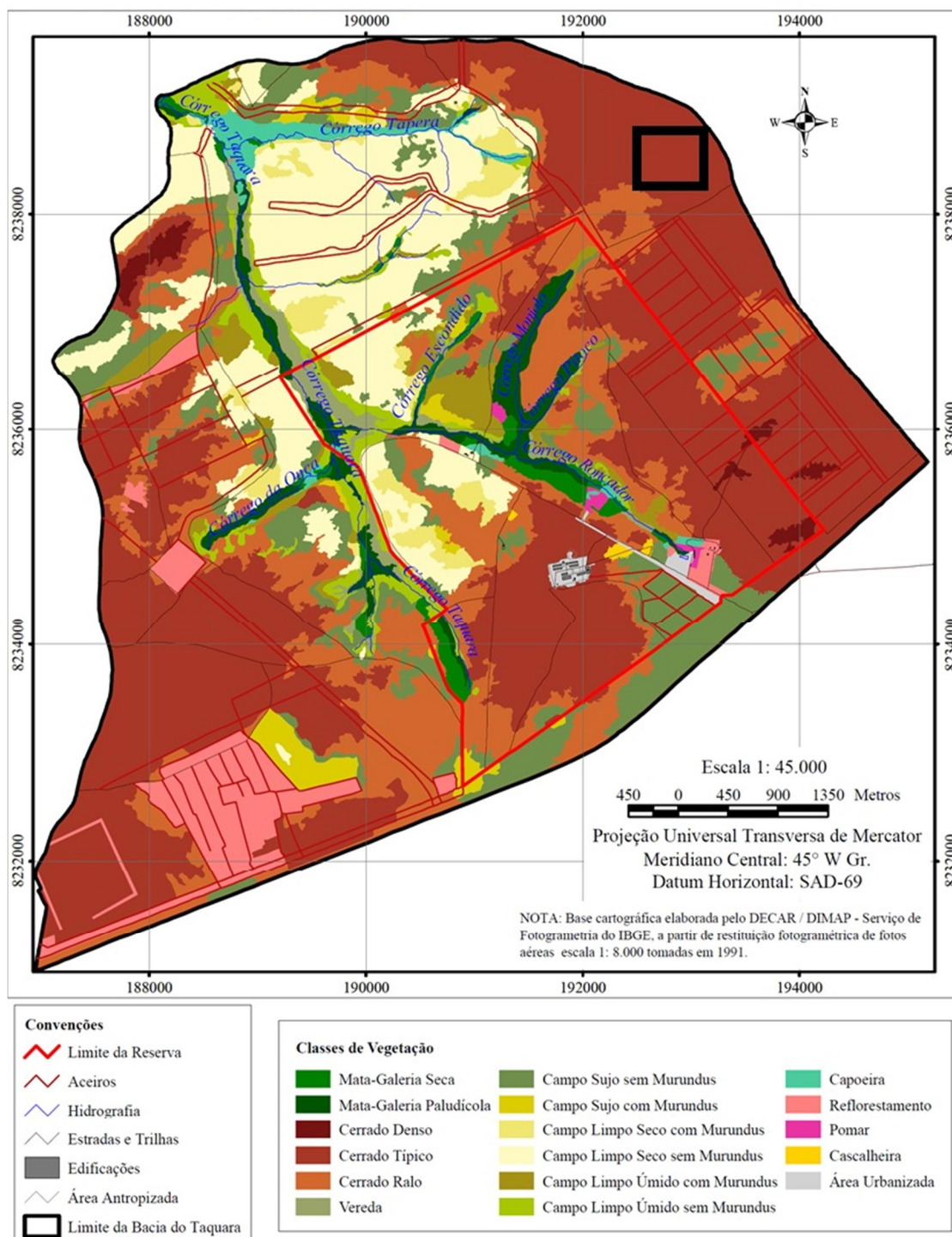


Figura 1. Mapa de vegetação da Reserva Ecológica do IBGE (RECOR-IBGE). O quadrado preto representa a localização do projeto de fertilização do cerrado.

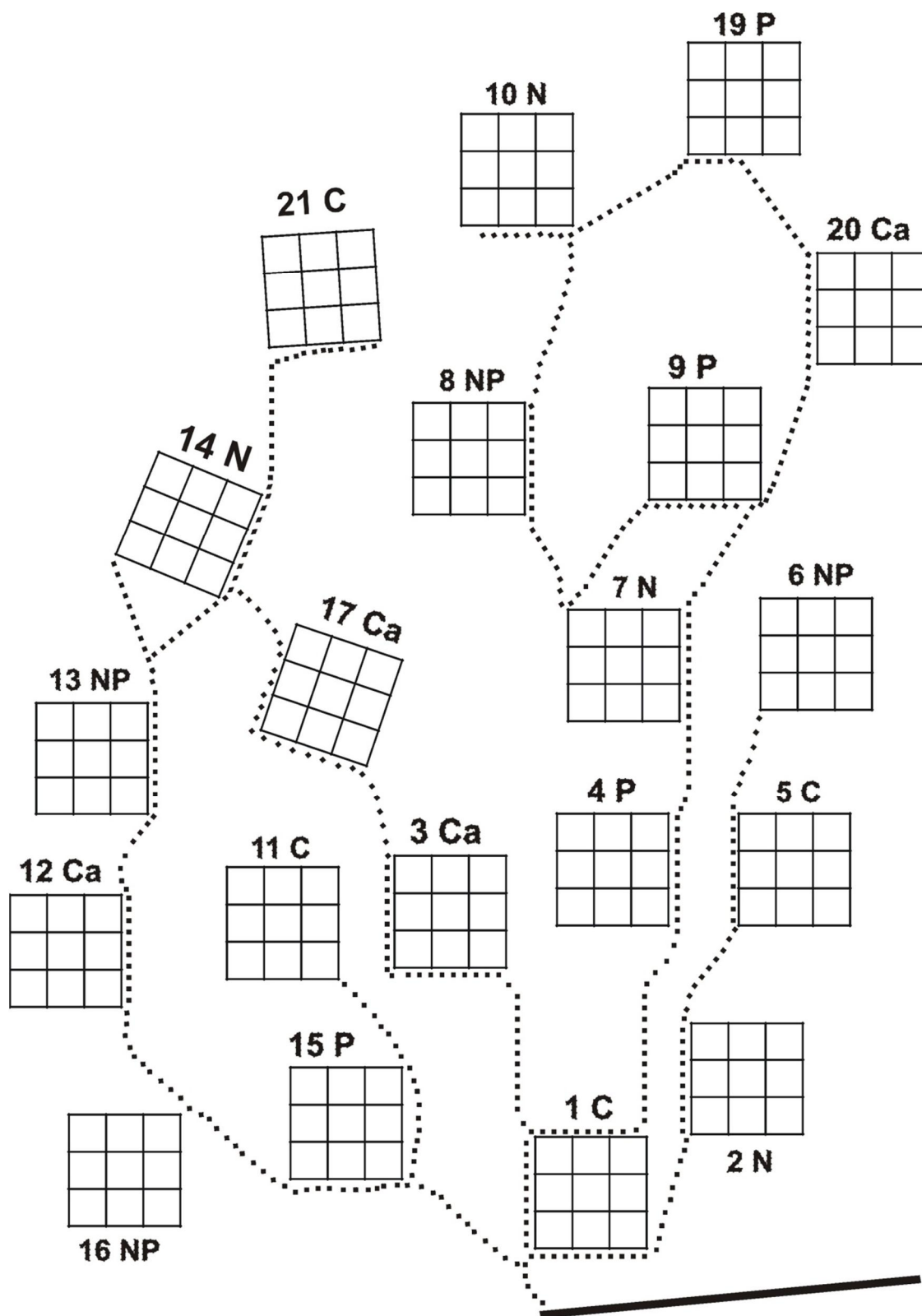


Figura 2. Mapa das parcelas do projeto "Estudo dos Efeitos das Mudanças Globais que Determinam a Estrutura e o Funcionamento de Ecossistemas de Cerrado", localizado na Reserva Ecológica do IBGE (RECOR-IBGE) onde foi realizado o presente estudo. Legenda: C ó parcelas controle; Ca ó parcelas cálcio; N- parcelas nitrogênio; NP ó parcelas nitrogênio + fósforo; P- parcelas fósforo.

### **2.3. Coletas das amostras de solo**

As parcelas do tratamento de fertilização foram amostradas ao longo do ano de 2009, para que se fosse possível abranger as duas estações, seca e chuvosa e os períodos de transição entre elas, seca/chuvosa e chuvosa/seca. As amostras de solo foram coletadas com o auxílio de tubos de PVC com 10 cm de diâmetro e no intervalo de profundidade entre 0-10 cm.

As amostras foram compostas por seis pontos ao acaso dentro de cada parcela do tratamento a ser amostrado. Assim para cada tratamento temos quatro amostras compostas independentes.

Após as coletas, em campo, as amostras destinadas às análises moleculares, pH e análise de nutrientes foram acondicionadas em sacos plásticos e mantidas refrigeradas. Para determinação do conteúdo gravimétrico as amostras foram acondicionadas em latas de alumínio e vedadas.

Ao chegar ao laboratório, as amostras destinadas às análises moleculares foram peneiradas através de malha de 2 mm, fracionadas em pequenas quantidades e congeladas em freezer -20°C. As amostras utilizadas para determinação de pH e análise de nutrientes foram peneiradas, secas em temperatura ambiente e armazenadas para as análises.

### **2.4. Análises físico-químicas do solo**

Os valores de pH do solo foram obtidos em água destilada e em solução de  $\text{CaCl}_2$  (0,01 M) na proporção 1:2,5. Após a agitação com bastão de vidro e repouso por 30 minutos foi realizada a leitura do pH, com auxílio de um potenciômetro.

As análises químicas do solo foram realizadas na Universidade Federal de Viçosa (UFV-MG), no laboratório de Solos Florestais. Os elementos P, K foram extraídos com o extrator Mehlich1 e os elementos Ca, Mg e Al com o extrator KCl (1mol/L). O carbono orgânico foi determinado pelo método Walkley-Black. A concentração de P disponível foi determinada por colorimetria, K trocável por fotometria de chama, Ca e Mg trocáveis por espectrofotometria de absorção atômica. O elemento Al por titulometria. As análises realizadas seguiram o protocolo estabelecido por EMBRAPA (1997).

A extração de  $\text{N-NO}_3^-$  e  $\text{N-NH}_4^+$  nas amostras de solo foi realizada pesando-se 2,0 g de solo fresco, adicionando-se 25 ml de KCl 2,0 M e agitando por 1 hora. Após a agitação, o extrato foi deixado em repouso durante a noite para posterior filtração do sobrenadante.

A determinação das concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  e  $\text{N-NH}_4^+$  foi realizada por espectrofotometria. As leituras de  $\text{N-NO}_3^-$  foram realizadas nos comprimentos de onda: 218, 228, 254 e 280 nm (MEIER, 1991). A concentração de  $\text{N-NH}_4^+$  foi determinada pelo método de Nessler após leitura no comprimento de onda 425 nm.

O teor gravimétrico de água no solo foi determinado pela diferença entre o peso fresco e o peso seco do solo, após secagem em estufa a 105° C até peso constante.

A análise de textura das amostras de solo foi realizada com o método do densímetro (BOUYOUCOS, 1926).

## **2.5. Análise da comunidade bacteriana do solo**

A extração de DNA total das amostras de solo foi feita através do kit FastDNA SPIN para extração de DNA de microrganismos em amostra de solo, marca MP Bio, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante, com uso do equipamento Fast Prep® 24 (MP Bio, USA). O produto da extração foi avaliado por eletroforese em gel de agarose 0,8 % contendo brometo de etídeo (2 g/ml) e o seu tamanho estimado por comparação com o marcador 1kb *plus ladder* (USB-EUA).

Foram selecionadas três amostras aleatoriamente por tratamento e mantidas para as estações, chuvosa e seca (agosto e dezembro de 2009), para serem enviadas ao laboratório para pirosequenciamento. Selecionamos somente três amostras devido ao elevado custo financeiro para sequenciar todas as réplicas. As amostras selecionadas foram: tratamento controle, parcelas 5, 11 e 21; tratamento cálcio, parcelas 3, 12 e 20; tratamento nitrogênio, parcelas 2, 10 e 14; tratamento nitrogênio+fósforo, parcelas 6, 8 e 16 e tratamento fósforo, parcelas 4, 15 e 19.

Para as análises de pirosequenciamento, os fragmentos de 16S rDNA das amostras de solo de cada tratamento (cerrado controle, parcela com cálcio, parcela com fósforo, parcela com nitrogênio e parcela com nitrogênio e fósforo) foram amplificados utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores que flanqueiam as regiões hipervariáveis V5 a V9 do 16S rDNA (ARMOUGON & RAOULT, 2009). Os pares de oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram 787F (5' ATTAGATACCCNGGTAG -

3') e 1492 R (5'-GNTACCTTGTTACGACTT - 3'), com os adaptadores A ou B da 454 Life Sciences - (ROESCH *et al.*, 2007).

A amplificação por PCR das sequências de 16S rDNA com 20  $\mu$ l de volume total de reação foi realizada através do protocolo: tampão de Taq polimerase 1X (Invitrogen); 3,0 mM de MgCl<sub>2</sub>; 10  $\mu$ mol de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,25 mM de dNTPs; 1,5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1  $\mu$ l de DNA. As concentrações das amostras de DNA variaram entre 1,08 ng/ $\mu$ l a 6,75 ng/ $\mu$ l em 25  $\mu$ l. A amplificação foi realizada utilizando desnaturação inicial de 3 min a 95°C, seguido por 25 ciclos com desnaturação por 30 segundos a 95°C, anelamento por 30 segundos a 58°C e extensão por 1,4 minutos a 72 °C, seguido por uma extensão final de 7 minutos a 72°C e resfriamento a 10°C. Os amplicons foram sequenciados por meio do sequenciador de nova geração GS FLX Titanium (454 Sequencing Center, Brandford, USA).

O processamento dos dados foi realizado por meio do *pipeline Qiime* (CAPORASO *et al.*, 2010). Sequências menores que 130 bp e com índice de qualidade inferior a 30 foram removidas. As sequências foram separadas por amostras através dos barcodes com 10 pb e depois agrupadas em filotipos usando Cd-hit (LI & GODZIK, 2006) com limiar de  $\times$  97% de similaridade entre as sequências. Sequências representativas foram classificadas usando Uclust contra o conjunto de dados básicos do RDP (*Ribosomal Database Project*). Os testes estatísticos sobre as diferenças taxonômicas entre as amostras foram calculados por meio do programa STAMP (PARKS & BEIKO, 2010).

## 2.6. Análises estatísticas

O modelo linear misto proposto por Laird & Ware (1982) foi utilizado para análise dos dados.

Os dados relativos às análises de solo, como pH, conteúdo gravimétrico de água, nitrato e amônio disponíveis e nutrientes foram testados quanto à sua normalidade e homocedacidade. Tais verificações foram feitas através das análises dos gráficos de resíduos gerados.

Usamos o fator "estação" como fixo, pois foram realizadas duas medições na mesma área em épocas diferentes e os parâmetros químicos como aleatórios.

Diferenças a 5 % de probabilidade foram consideradas significativas. As análises estatísticas foram realizadas no programa R (versão 2.13.0, pacote NLME 2.13.2 - R *Development Core Team* 2008).

O programa estatístico PAST (*Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis*, UK) foi usado para as análises de componentes principais (PCA).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Características físico-químicas do solo

A distribuição da precipitação acumulada no período de estudo (agosto de 2009 a dezembro de 2009) está apresentada na Figura 3. No mês de agosto, até a data da coleta das amostras de solo (11/08/2009), a precipitação acumulada no mês foi de 0 mm. Para o mês de dezembro, até a data da coleta das amostras de solo (15/12/2009), a precipitação acumulada no mês foi de 120,7 mm.

O conteúdo gravimétrico de água no solo na profundidade 0-10 cm respondeu às variações da precipitação durante o ano (Figura 4) e foram detectadas diferenças significativas entre as amostras das estações seca e chuvosa. A umidade do solo variou de 16,9% (agosto 2009) a 44,8% (dezembro 2010) entre os tratamentos. Entretanto, não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos.

Com relação ao pH do solo, as amostras do tratamento com cálcio apresentaram os maiores valores médios em relação ao tratamento controle, variando de 6,0 a 6,8 em água e de 5,7 e 6,6 em  $\text{CaCl}_2$ . Já os valores médios de pH nas amostras de solos dos demais tratamentos não diferiram significativamente entre si e variaram de 3,6 a 4,5 (Figura 5 A e B).

As maiores concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  foram medidas em amostras dos tratamentos com cálcio, nitrogênio e nitrogênio+fósforo tanto na estação seca quanto na chuvosa. Não houve diferença significativa entre os tratamentos controle e fósforo (Figura 5 C).

As maiores concentrações de  $\text{N-NH}_4^+$  foram medidas nas amostras coletadas nos tratamentos com cálcio e com fósforo nas duas estações, seca e chuvosa (Figura 5 D).

As concentrações de P disponível no solo dos tratamentos estudados foram significativamente maiores somente nos tratamentos nitrogênio+fósforo e fósforo, com variações entre 32,8  $\text{mg/dm}^3$  a 63,0  $\text{mg/dm}^3$ . Para os outros tratamentos as variações foram de 2,3  $\text{mg/dm}^3$  a 3,6  $\text{mg/dm}^3$  (Figura 6 A).

As concentrações de K disponível no solo foram maiores nas parcelas do tratamento com nitrogênio+fósforo e fósforo na estação chuvosa, com valores entre 31  $\text{mg/dm}^3$  e 40  $\text{mg/dm}^3$ . No tratamento com cálcio houve uma diminuição da concentração de K disponível nas duas estações quando comparadas aos outros tratamentos. Os valores médios para os tratamentos variaram entre 11  $\text{mg/dm}^3$  e 33

mg/dm<sup>3</sup> (Figura 6 B). Contrariamente, a concentração de Mg disponível no solo aumentou nas parcelas do tratamento com cálcio (Figura 6 C). Nas parcelas dos outros tratamentos, não houve diferenças significativas na concentração de Mg disponível. As concentrações de magnésio disponível no solo foram maiores nas parcelas do tratamento cálcio variando entre 5,2 mg/dm<sup>3</sup> a 6,9 mg/dm<sup>3</sup>. Nos outros tratamentos não houve diferenças significativas com as concentrações variando entre 0,07 mg/dm<sup>3</sup> e 0,17 mg/dm<sup>3</sup> (Figura 6 E). Assim, os valores de capacidade de troca catiônica (CTC) (Figura 7 B) foram significativamente maiores nas parcelas do tratamento cálcio, variando entre 8,0 cmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup> e 10,7 cmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup>. Os valores nos demais tratamentos variaram de 1,0 cmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup> a 2,3 cmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup>.

As concentrações de Al disponível no solo (Figura 6 D) foram maiores para as parcelas dos tratamentos nitrogênio e nitrogênio+fósforo. As parcelas do tratamento cálcio não apresentaram valores detectáveis para alumínio disponível no solo. Os valores médios encontrados para os outros tratamentos foram 0,9 mg/dm<sup>3</sup> a 1,4 mg/dm<sup>3</sup>.

Os valores dos teores de matéria orgânica (Figura 7 A) para os solos dos tratamentos analisados não apresentaram diferenças significativas, com valores entre 76 g/kg a 84,5 g/kg.

A análise dos componentes principais com os parâmetros químicos dos solos amostrados (Figura 8) separou as parcelas do tratamento cálcio e agrupou as parcelas controle no mesmo quadrante que os tratamentos de fósforo, nitrogênio e nitrogênio + fósforo. As parcelas do tratamento cálcio também se separam em quadrantes diferentes para as amostras coletadas nas estações chuvosa e seca. Os demais tratamentos também se separam quanto às estações, seca e chuvosa.



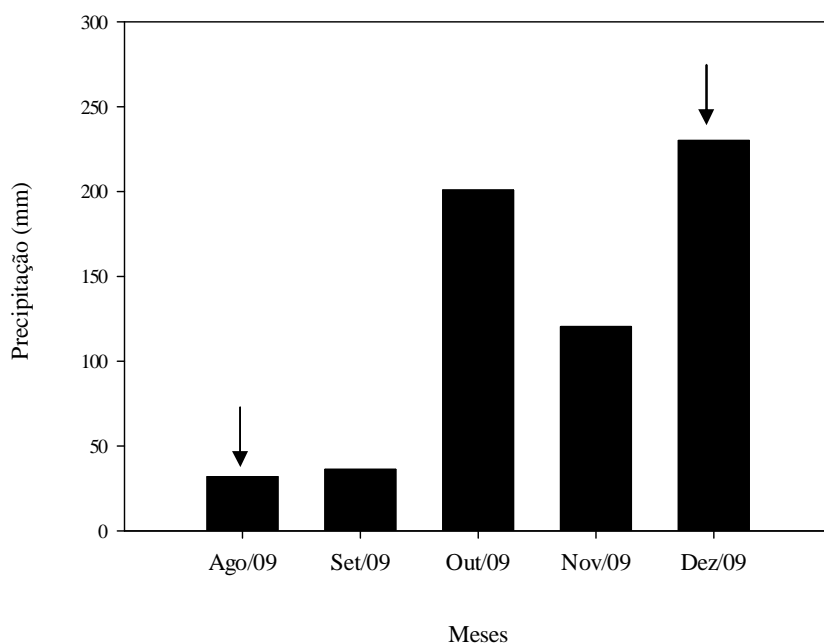


Figura 3. Distribuição da precipitação mensal (mm) durante o período de agosto de 2009 a dezembro de 2009. Dados da estação climatológica da Reserva Ecológica do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, em Brasília, DF. Os meses indicados com setas representam os meses das coletas utilizadas neste estudo.

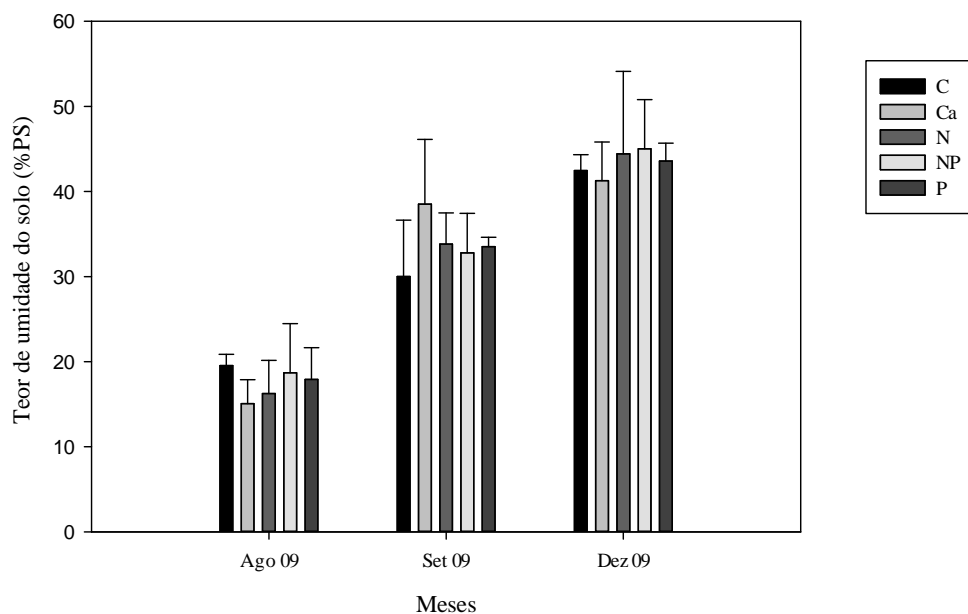


Figura 4. Valores médios do teor de umidade no solo (%) obtidos em parcelas de cerrado sentido restrito submetidas à adição de nutrientes, no intervalo de 0 a 10 cm de profundidade do solo, entre agosto de 2009 a dezembro de 2009. As barras verticais representam o desvio padrão das médias (n=4). Legenda: C ó parcelas controle; Ca ó parcelas cálcio; N ó parcelas nitrogênio; NP ó parcelas nitrogênio+fósforo; P ó parcelas fósforo.

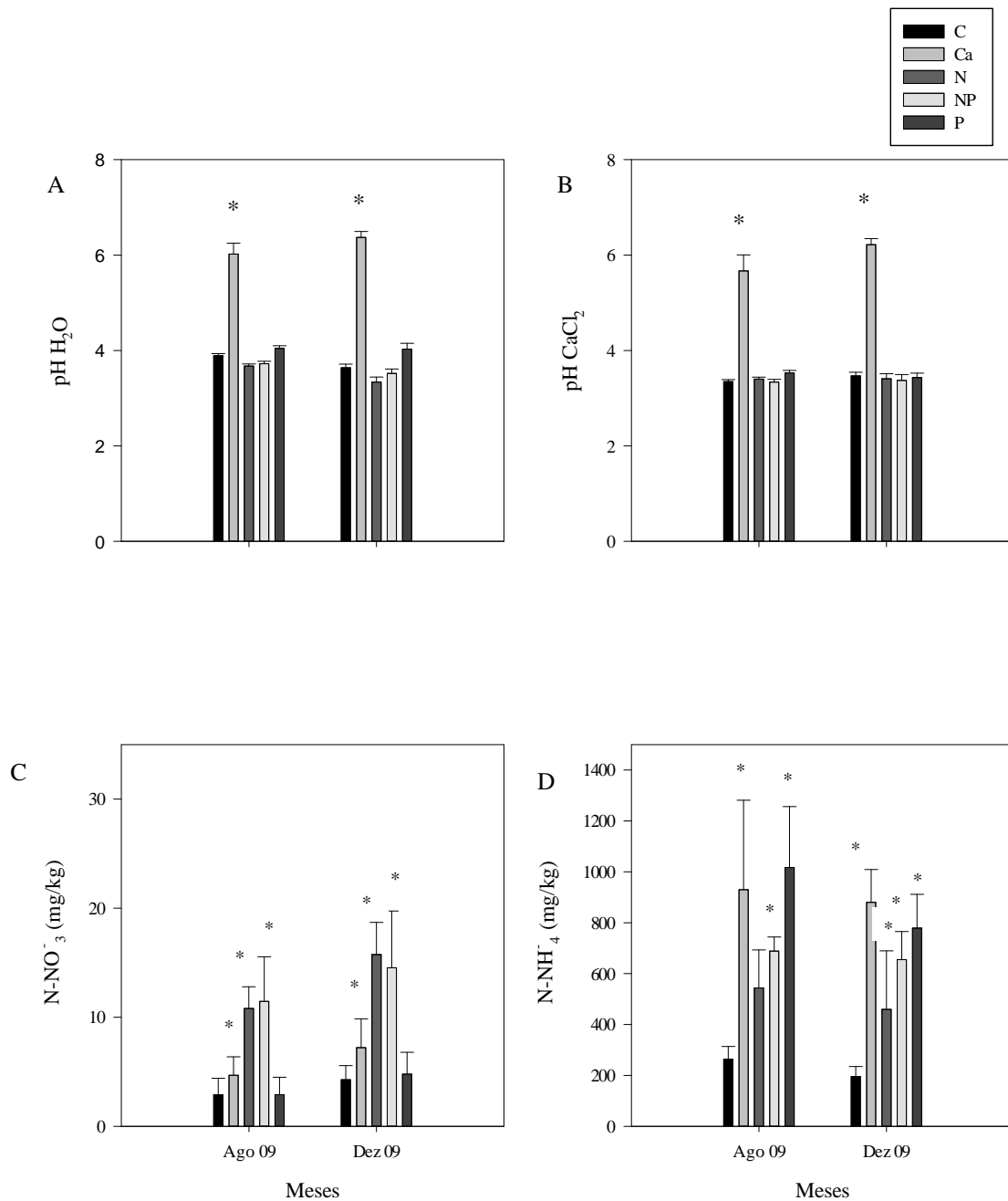


Figura 5. Valores médios de pH em H<sub>2</sub>O (A) e de pH em CaCl<sub>2</sub> (B), concentrações de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>(mg/kg) (C) e N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (mg/kg) (D) obtidos em parcelas de cerrado sentido restrito submetidas à adição de nutrientes, no intervalo de 0 a 10 cm de profundidade do solo, nos meses de agosto de 2009 e dezembro de 2009. As barras verticais representam os desvios padrão das médias (n=4). Diferenças significativas com o tratamento controle estão indicadas por asteriscos (\* = 5 %). Legenda: C ó parcelas controle; Ca ó parcelas cálcio; N ó parcelas nitrogênio; NP ó parcelas nitrogênio+fósforo; P ó parcelas fósforo.

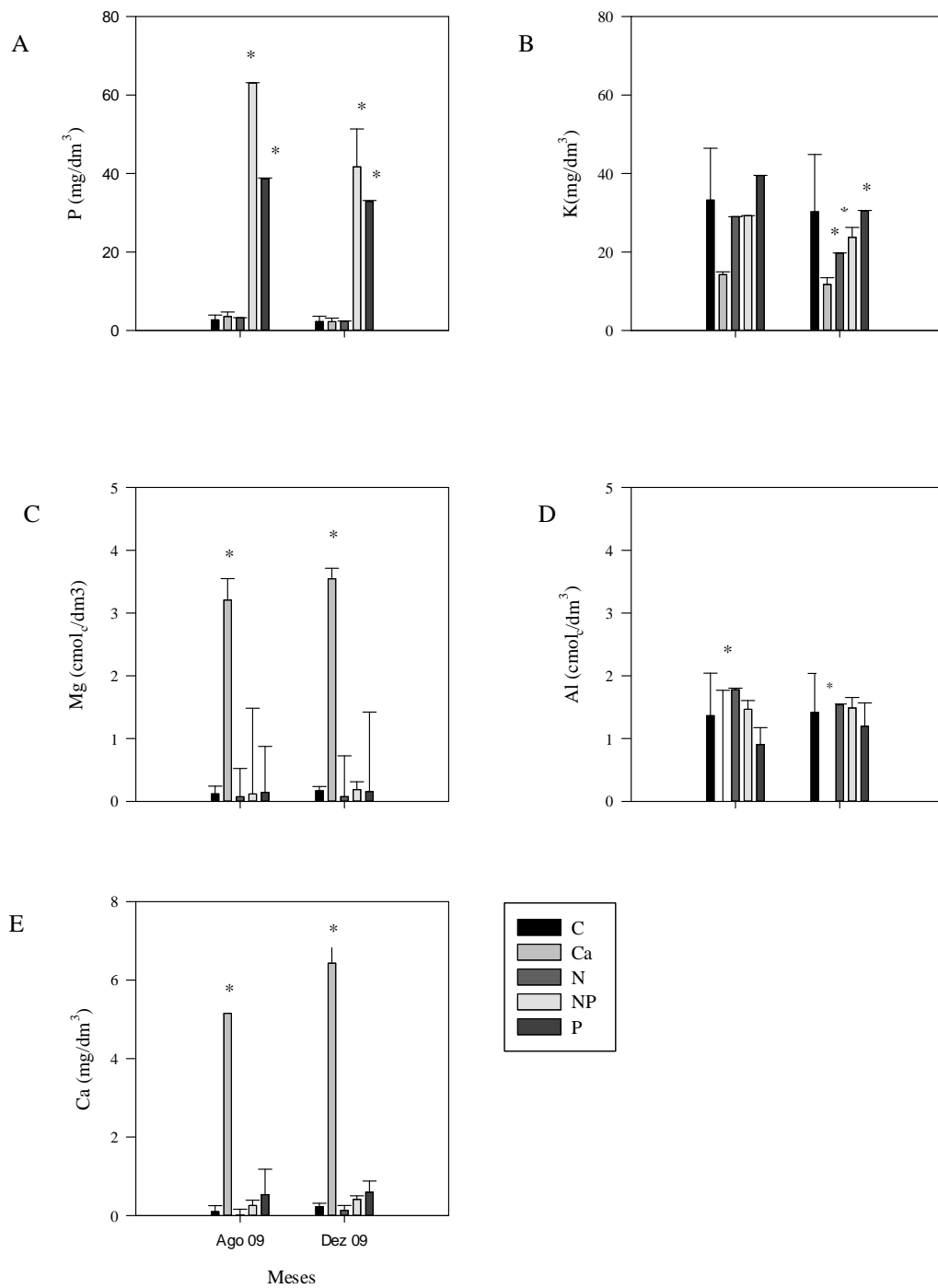


Figura 6. Concentrações de P (A), K (B) ( $\text{mg}/\text{dm}^3$ ), Mg (C), Al ( $\text{cmol}_c/\text{dm}^3$ ) (D) e Ca disponíveis ( $\text{mg}/\text{dm}^3$ ) (E) obtidas em parcelas de cerrado sentido restrito submetidas à adição de nutrientes, no intervalo de 0 a 10 cm de profundidade do solo, nos meses de agosto de 2009 e dezembro de 2009. As barras verticais representam os desvios padrão das médias ( $n=4$ ). Diferenças significativas com o tratamento controle estão indicadas por asteriscos (\* = 5 %). Legenda: C ó parcelas controle; Ca ó parcelas cálcio; N ó parcelas nitrogênio; NP ó parcelas nitrogênio+fósforo; P ó parcelas fósforo.

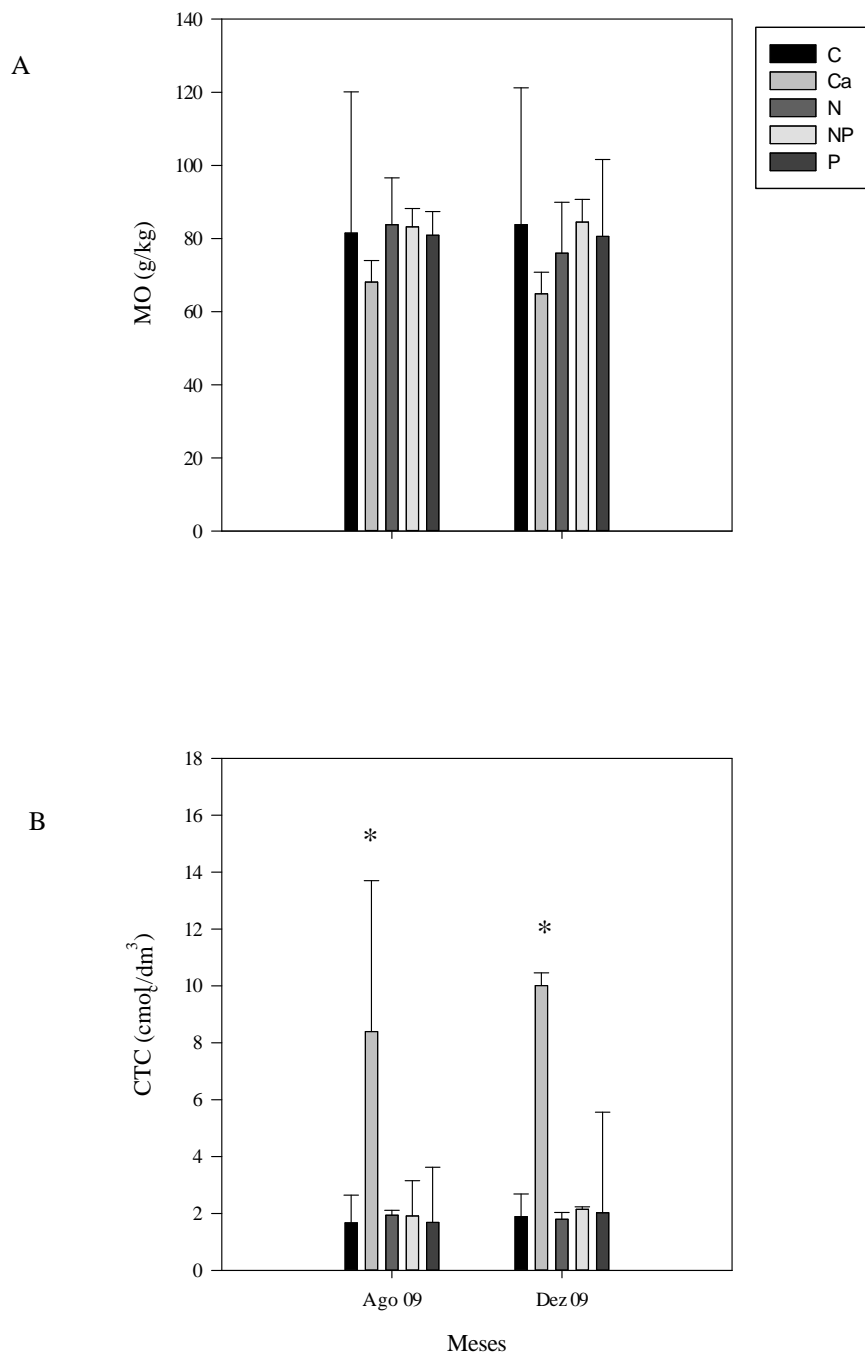


Figura 7. Teor de matéria orgânica (g/kg) (A) e capacidade de troca catiônica ( $\text{cmol/dm}^3$ ) (B) ó obtidas em parcelas de cerrado sentido restrito submetidas à adição de nutrientes, no intervalo de 0 a 10 cm de profundidade do solo, nos meses de agosto de 2009 e dezembro de 2009. As barras verticais representam o desvio padrão das médias ( $n=4$ ). Diferenças significativas com o tratamento controle estão indicadas por asteriscos (\* = 5 %). Legenda: C ó parcelas controle; Ca ó parcelas cálcio; N ó parcelas nitrogênio; NP ó parcelas nitrogênio+fósforo; P ó parcelas fósforo.

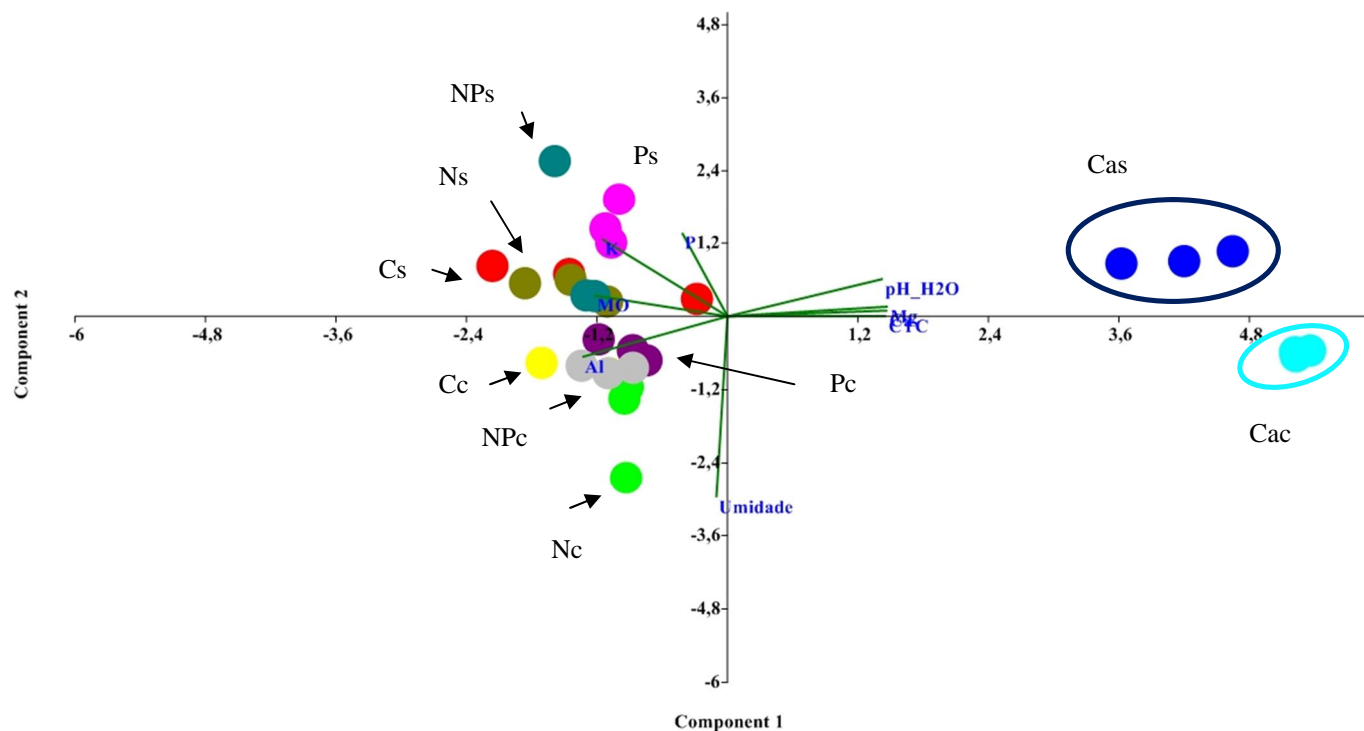


Figura 8. Análise dos componentes principais (PCA) com os parâmetros químicos dos solos analisados. Legenda: Cc- tratamento cerrado controle chuva; Cs- tratamento cerrado seca; Cac ó tratamento cálcio chuva; Cas - tratamento cálcio seca; Nc- tratamento nitrogênio chuva; Ns ó tratamento nitrogênio seca; NPc ó tratamento nitrogênio+fósforo chuva; NPs ó tratamento nitrogênio+fósforo seca; Pc- tratamento fósforo chuva; Ps- tratamento fósforo seca.

### 3.2. Análise da comunidade bacteriana do solo

Após as análises de pirosequenciamento, foram obtidas aproximadamente 233 000 sequências de alta qualidade para as parcelas dos solos analisados.

Usando a classificação do RDP II (*Ribosomal Database Project*), com um índice de confiança de 95%, um total de 18 filos foi identificado nas amostras das parcelas experimentais. Dez filos (AD3, Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Firmicutes, Planctomycetes, Proteobacteria, Verrumicrobia e WSP-2) foram considerados abundantes. Consideraram-se abundantes os filos com frequência maior que 1% e sete filos foram considerados pouco abundantes, com frequência menor que 1% (Armatimonadetes, Chlamydiae, Elusimicrobia, Gemmatimonadetes, BRC1, TM6, TM7).

Entre os filos mais abundantes, o filo Acidobacteria, o grupo de *ôbactérias* não classificadas e o filo Proteobacteria apresentaram a maior abundância, nos cinco tratamentos analisados (Figura 9 A, B, C, D e E) sendo que o filo Acidobacteria foi o mais abundante nas duas estações. Foram encontradas também sequências correspondentes a dois grupos do filo Acidobacteria (Chloroacidobacteria e Solibacteres) e um grupo representativo (8,1%) não classificado.

O filo Proteobacteria apresentou sequências das classes Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria e Gammaproteobacteria, além de sequências de Proteobacteria não classificadas, nas estações chuvosa e seca, nas parcelas de todos os tratamentos. Somente nas parcelas do tratamento com fósforo, o filo Proteobacteria apresentou maiores valores de abundância na estação seca.

A abundância dos filos a partir do filo Proteobacteria variou entre os tratamentos. As parcelas dos tratamentos cerrado controle, nitrogênio e nitrogênio+fósforo apresentaram o filo AD3 como mais abundante após Proteobacteria. As classes ABS-6 e JG37-AG-4 do filo AD3 também apresentaram sequências nas amostras analisadas. Já nas parcelas dos tratamentos cálcio e fósforo, os filos mais abundantes após Proteobacteria foram Actinobacteria e Verrumicrobia, respectivamente. Sequências das classes de Spartobacteria e Verrumicrobiae também foram observadas, além de uma classe Verrumicrobia não classificada.

Entre os filos pouco abundantes, os filos TM7 e Chlamydiae foram os mais representativos (Figura 10 A, B, C, D e E). Após esses filos, observou-se a seguinte

ordem decrescente em abundância: Armatimonadetes, Elusimicrobia, BRC1, TM6 e Gemmatimonadetes.

Detectou-se também a presença de filós raros. O filo Gemmatimonadetes apresentou distribuição bem diferenciada entre os tratamentos. Nas parcelas do tratamento controle sua presença foi detectada nas duas estações, assim como nas parcelas do tratamento fósforo, mas com maior abundância na estação chuvosa. Já nas parcelas do tratamento cálcio esse filo foi detectado somente nas amostras da estação chuvosa ao contrário do observado nas parcelas dos tratamentos nitrogênio e nitrogênio+fósforo, onde o filo Gemmatimonadetes só foi detectado na estação seca. Adicionalmente, nas parcelas do tratamento cálcio não foi detectado o filo BRC1 em nenhuma das estações, chuvosa ou seca.

Comparando-se as frequências relativas dos filós bacterianos dos cinco tratamentos analisados através do programa STAMP utilizando o teste ANOVA -Tukey-Kramer, os filós mais abundantes que apresentaram diferenças significativas entre estes foram: Verrumicrobia, Acidobacteria, Planctomycetes e Proteobacteria (Figuras 11 e 12). Para os filós menos abundantes, os filós foram Elusimicrobia e Armatimonadetes (Figura 13).

Quando comparamos as frequências relativas dos filós bacterianos mais abundantes em relação às estações através do programa STAMP utilizando o teste ANOVA -Tukey-Kramer, os filós que apresentaram diferenças significativas foram: Proteobacteria, Planctomycetes e Firmicutes (Figura 14 e 15). Para os filós menos abundantes, os filós foram Elusimicrobia e Armatimonadetes (Figura 16).

As diferenças entre a composição das comunidades bacterianas do solo nos tratamentos foi avaliada através da Análise de Coordenadas Principais (PCoA) no programa Unifrac. Através destas análises podem-se observar as separações entre os tratamentos (Figura 17 A e 18 B). Realizaram-se análises com parâmetros *unweighted* (Figura 17 A), onde é avaliada a presença-ausência de sequências, e *weighted* (Figura 17 B), onde é avaliada a abundância relativa de cada grupo de sequências.

Com a análise PCoA *unweighted* (Figura 17 A) os resultados mostram a separação bem definida das amostras do tratamento com cálcio (estação chuvosa e seca) das demais amostras dos outros tratamentos.

Na análise PCoA *weighted* (Figura 17 B), as amostras referentes ao tratamento cálcio coletadas nas estações chuvosa e seca também separam-se das demais amostras.

A análise dos componentes principais (PCA) com os filos mais abundantes permitiu visualizar a mesma separação do tratamento cálcio, incluindo a separação entre as estações chuvosa e seca, enquanto os outros tratamentos não estão nitidamente agrupados (Figura 18).



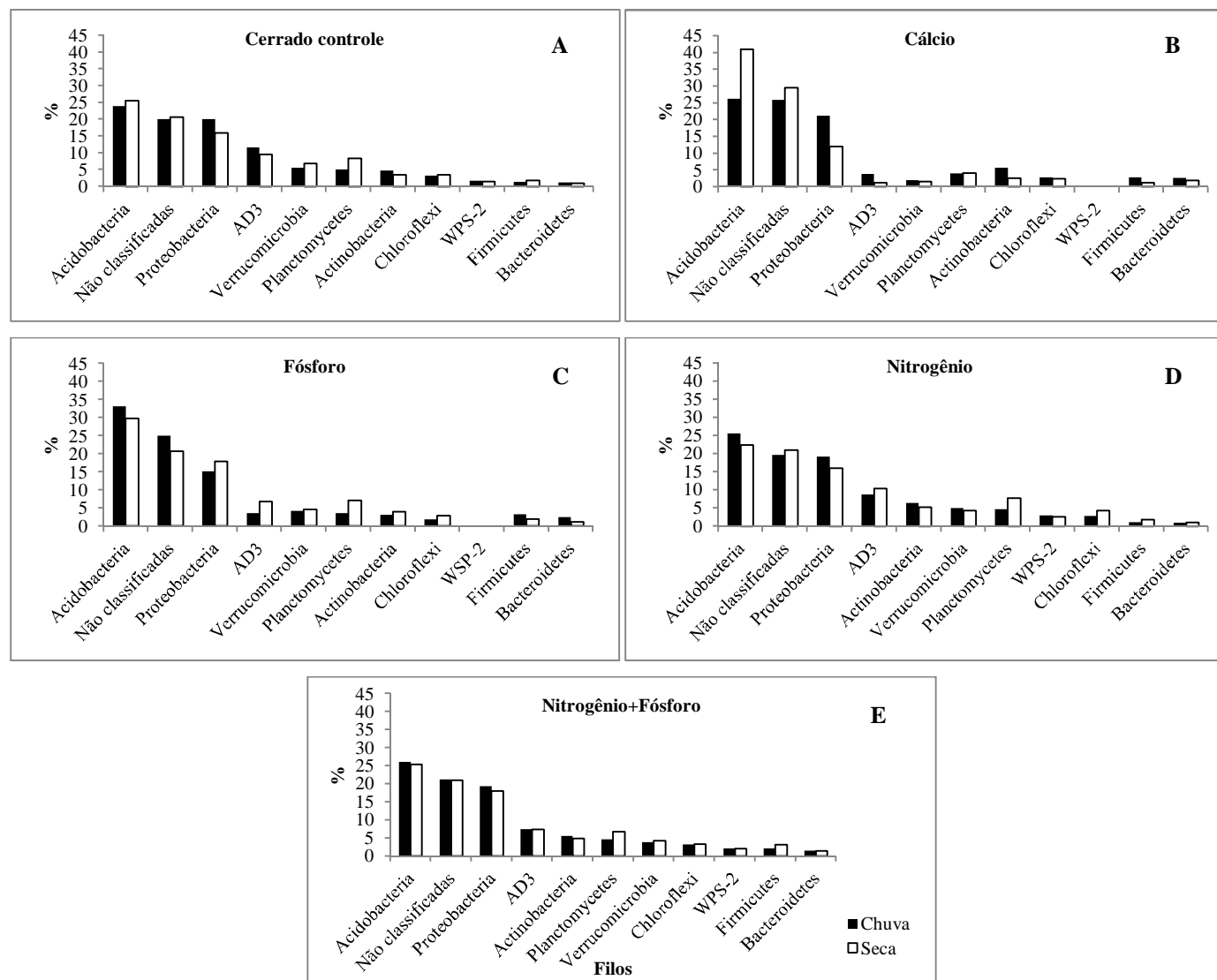


Figura 9. Frequência dos filos bacterianos dominantes presentes no solo de áreas de cerrado sentido restrito submetidos à adição de nutrientes, de acordo com análises de pirosequenciamento, classificados pelo *Ribosomal Database Project* com limite de confiança de 95%. (A) Cerrado controle; (B) Tratamento com cálcio; (C) Tratamento com fósforo; (D) Tratamento com nitrogênio; (E) Tratamento com nitrogênio+fósforo.

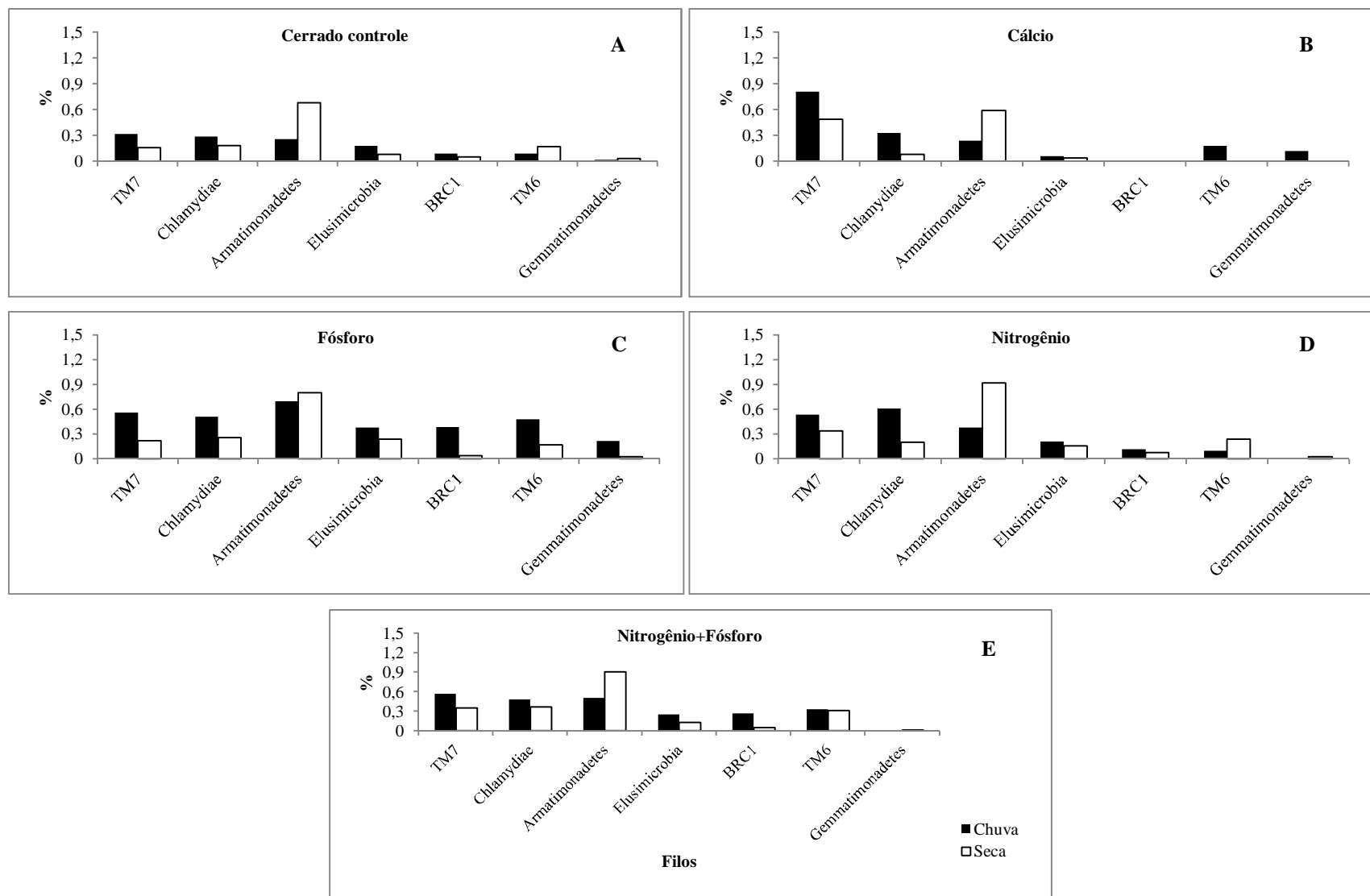


Figura 10. Frequência dos filis bacterianos menos abundantes presentes no solo de áreas de cerrado sentido restrito submetidos à adição de nutrientes, de acordo com análises de pirosequenciamento, classificados pelo *Ribosomal Database Project* com limite de confiança de 95%. (A) Cerrado controle; (B) Tratamento com cálcio; (C) Tratamento com fósforo; (D) Tratamento com nitrogênio; (E) Tratamento com nitrogênio+fósforo.

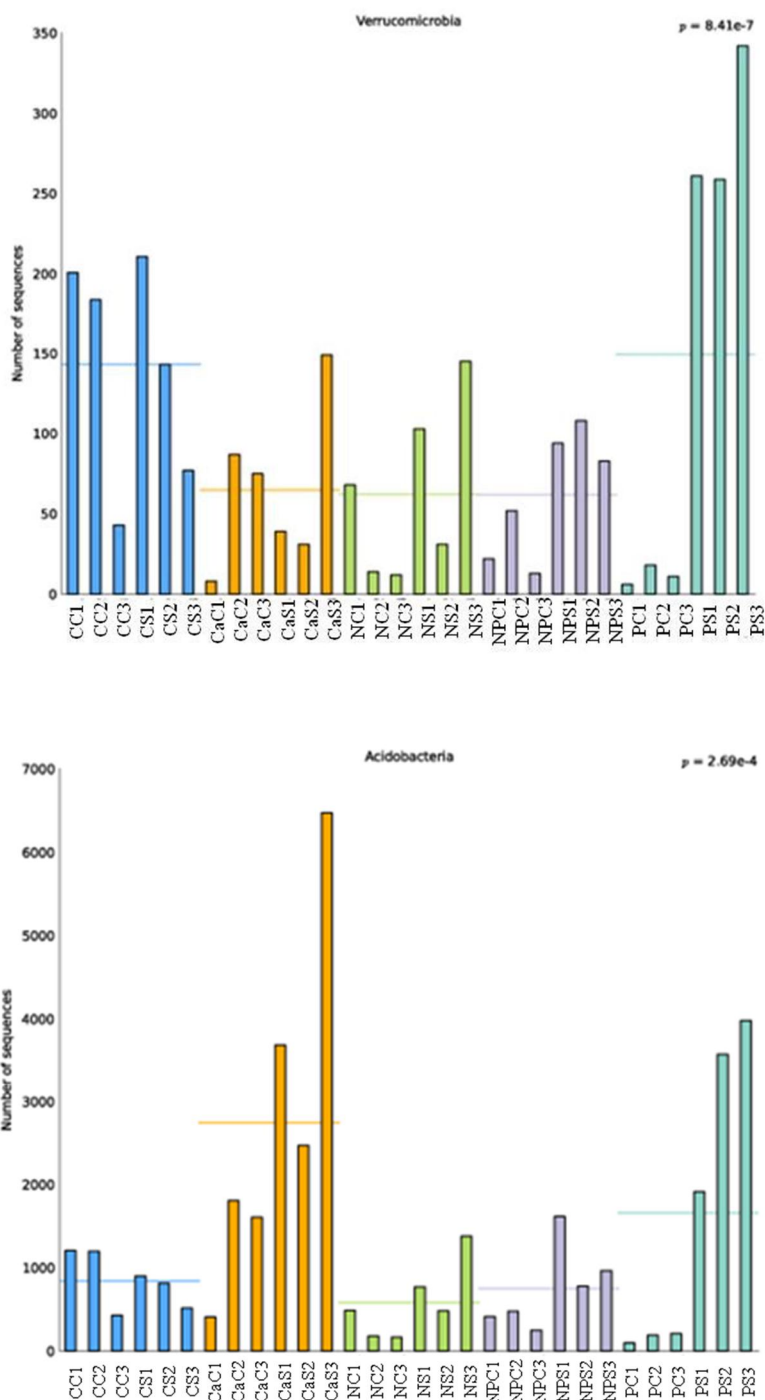


Figura 11. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre filos bacterianos mais abundantes presentes no solo de cerrado sentido restrito submetidos à adição de nutrientes por meio do programa STAMP utilizando o teste ANOVA -Tukey-Kramer. O valor médio para cada grupo é demonstrado em forma de linha. Legenda: CC- cerrado controle chuva; CS ó cerrado controle seca; CaC ó cálcio chuva; CaS ó cálcio seca; NC ó nitrogênio chuva; NS ó nitrogênio seca; NPC ó nitrogênio+fósforo chuva; NPS ó nitrogênio+fósforo seca; PIC ó fósforo chuva; PS ó fósforo seca. Números de 1 a 3 representam as réplicas dos tratamentos.

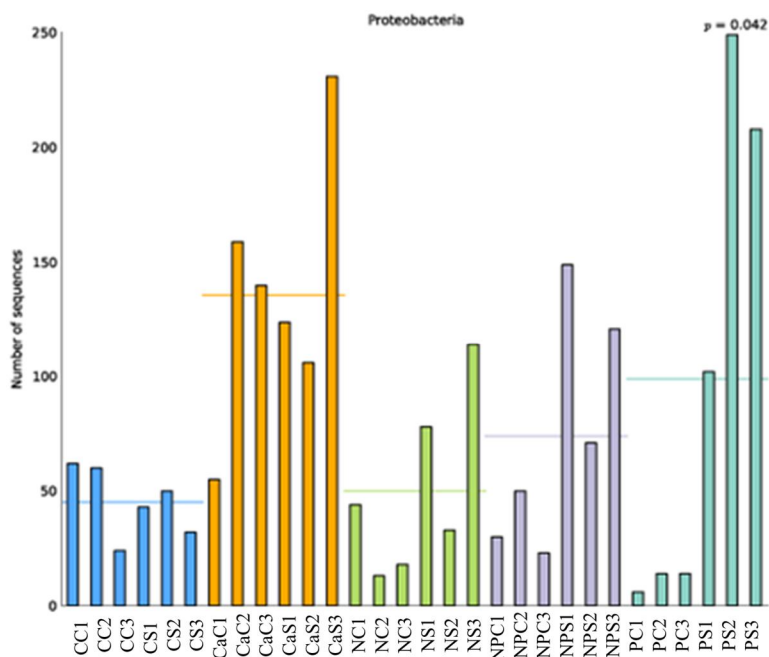
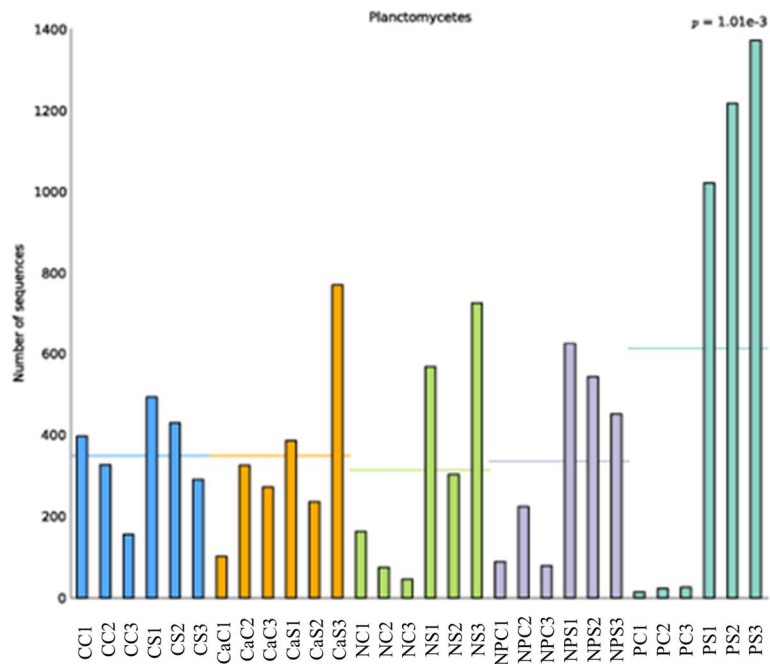


Figura 12. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre filos bacterianos mais abundantes presentes no solo de cerrado sentido restrito submetidos à adição de nutrientes por meio do programa STAMP utilizando o teste ANOVA -Tukey-Kramer. O valor médio para cada grupo é demonstrado em forma de linha. Legenda: CIC- cerrado controle chuva; SCIS ó cerrado controle seca; CaC ó cálcio chuva; SCAIS ó cálcio seca; NIC ó nitrogênio chuva; SNIS ó nitrogênio seca; NFIC ó nitrogênio+fósforo chuva; SNFIS ó nitrogênio+fósforo seca; FIC ó fósforo chuva; SFIS ó fósforo seca. Números de 1 a 3 representam as réplicas dos tratamentos.

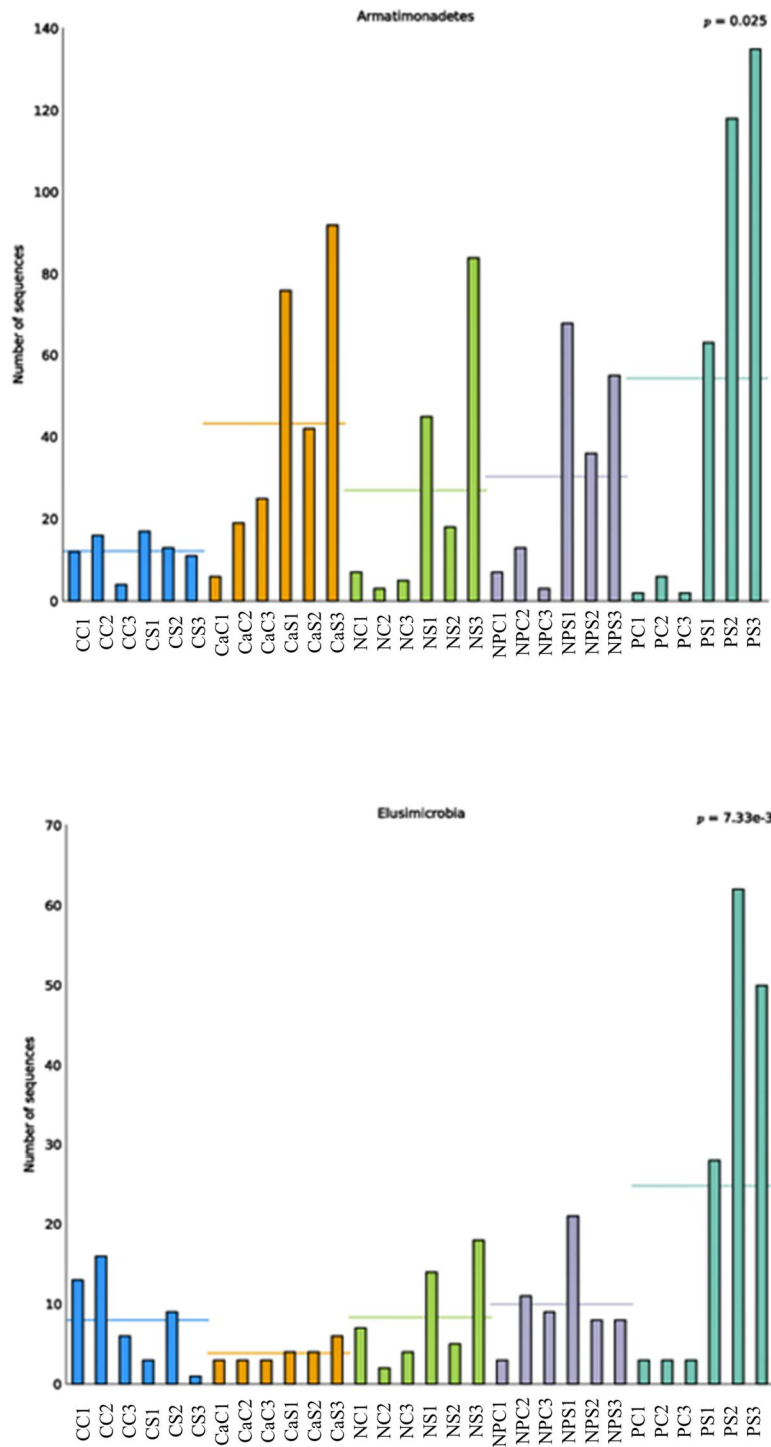


Figura 13. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre filos bacterianos menos abundantes presentes no solo de cerrado sentido restrito submetidos à adição de nutrientes por meio do programa STAMP utilizando o teste ANOVA -Tukey-Kramer. O valor médio para cada grupo é demonstrado em forma de linha. Legenda: CIC- cerrado controle chuva; SCIS ó cerrado controle seca; CAIC ó cálcio chuva; SCAIS ó cálcio seca; NIC ó nitrogênio chuva; SNIS ó nitrogênio seca; NFIC ó nitrogênio+fósforo chuva; SNFIS ó nitrogênio+fósforo seca; FIC ó fósforo chuva; SFIS ó fósforo seca. Números de 1 a 3 representam as réplicas dos tratamentos.

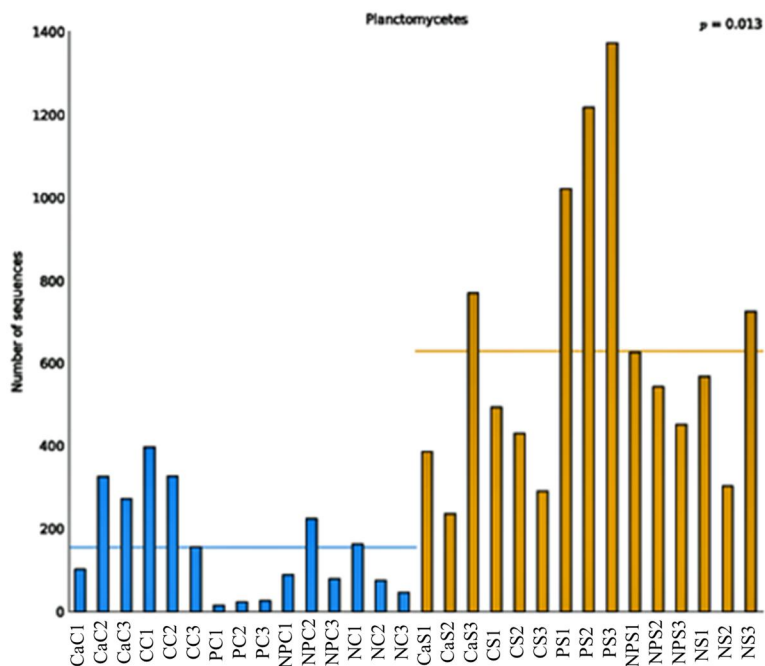
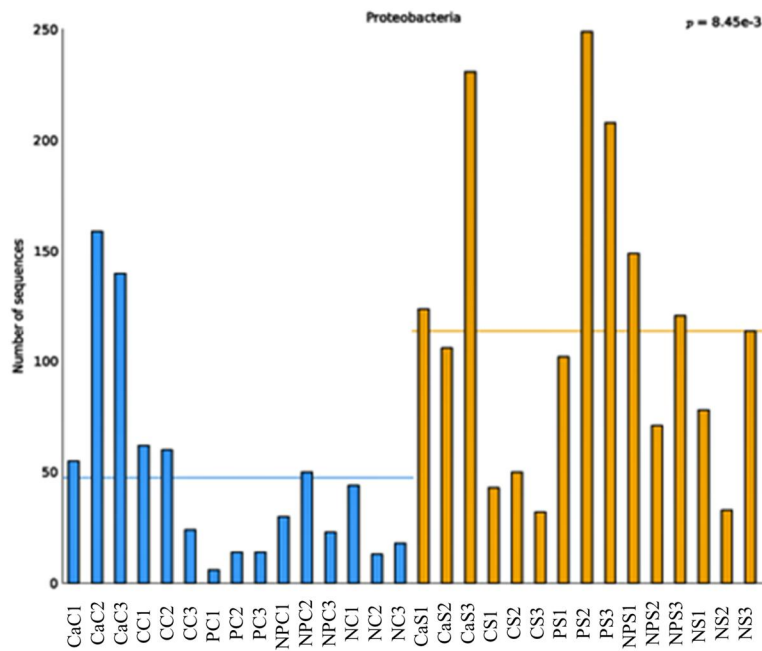


Figura 14. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as estações chuvosa (azul) e seca (marrom) entre filos bacterianos mais abundantes presentes no solo de cerrado sentido restrito submetidos à adição de nutrientes por meio do programa STAMP utilizando o teste ANOVA -Tukey-Kramer. O valor médio para cada grupo é demonstrado em forma de linha. Legenda: CIC- cerrado controle chuva; SCIS ó cerrado controle seca; CAIC ó cálcio chuva; SCAIS ó cálcio seca; NIC ó nitrogênio chuva; SNIS ó nitrogênio seca; NFIC ó nitrogênio+fósforo chuva; SNFIS ó nitrogênio+fósforo seca; FIC ó fósforo chuva; SFIS ó fósforo seca. Números de 1 a 3 representam as réplicas dos tratamentos.

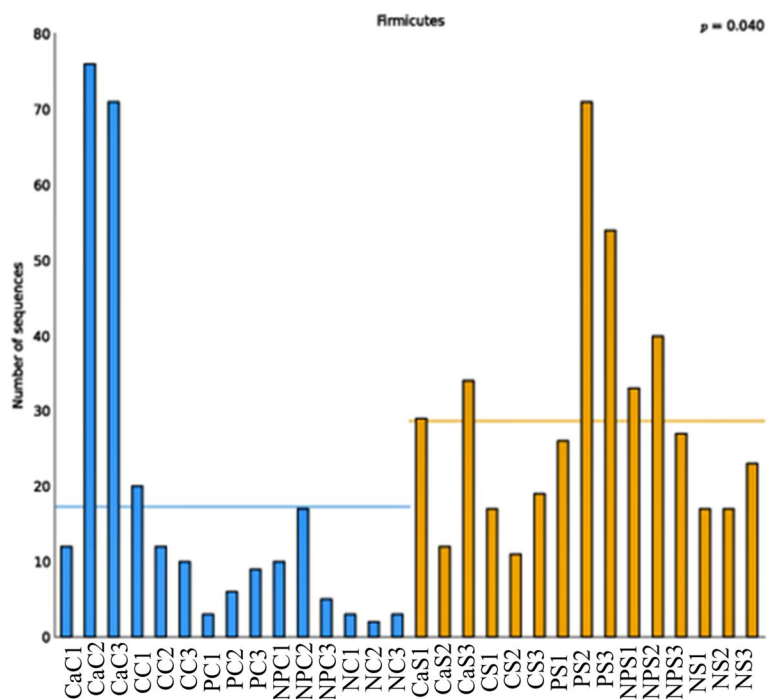


Figura 15. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as estações chuvosa (azul) e seca (marrom) entre filos bacterianos mais abundantes presentes no solo de cerrado sentido restrito submetidos à adição de nutrientes por meio do programa STAMP utilizando o teste ANOVA -Tukey-Kramer. Legenda: CIC- cerrado controle chuva; SCIS ó cerrado controle seca; CAIC ó cálcio chuva; SCAIS ó cálcio seca; NIC ó nitrogênio chuva; SNIS ó nitrogênio seca; NFIC ó nitrogênio+fósforo chuva; SNFIS ó nitrogênio+fósforo seca; FIC ó fósforo chuva; SFIS ó fósforo seca. Números de 1 a 3 representam as réplicas dos tratamentos.

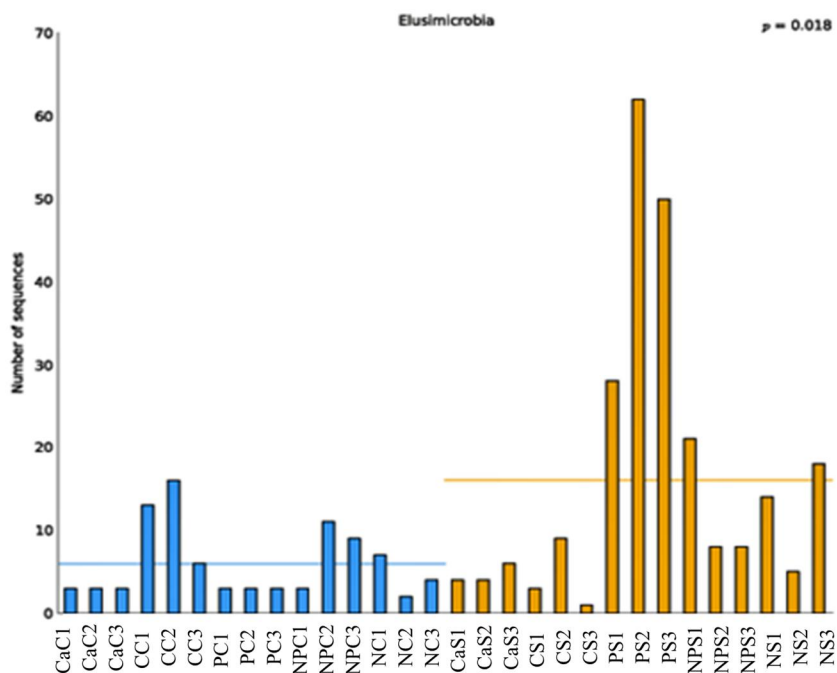
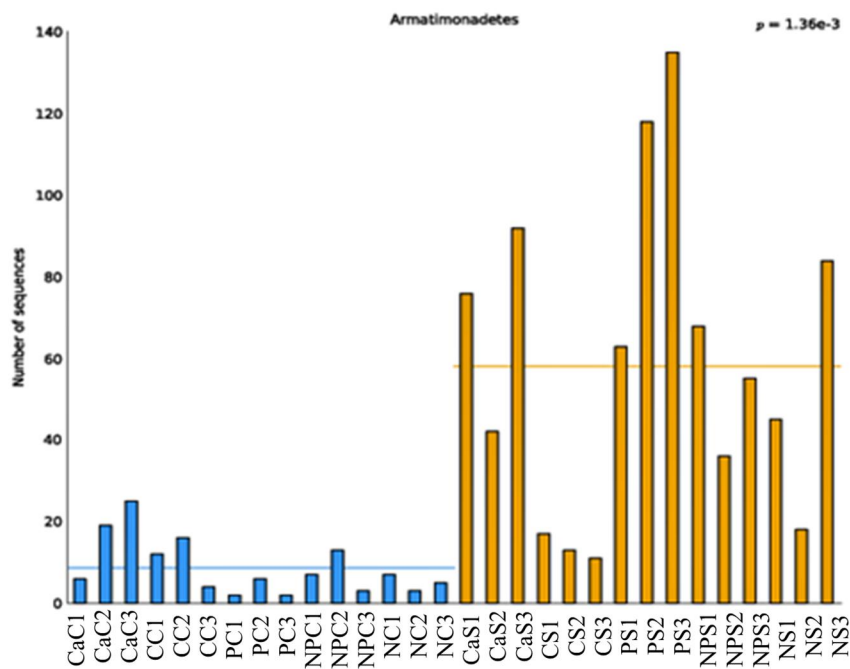


Figura 16. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as estações chuvosa (azul) e seca (marrom) entre filós bacterianos menos abundantes presentes no solo de cerrado sentido restrito submetidos à adição de nutrientes por meio do programa STAMP utilizando o teste ANOVA -Tukey-Kramer. O valor médio para cada grupo é demonstrado em forma de linha. Legenda: CIC- cerrado controle chuva; SCIS ó cerrado controle seca; CAIC ó cálcio chuva; SCAIS ó cálcio seca; NIC ó nitrogênio chuva; SNIS ó nitrogênio seca; NFIC ó nitrogênio+fósforo chuva; SNFIS ó nitrogênio+fósforo seca; FIC ó fósforo chuva; SFIS ó fósforo seca. Números de 1 a 3 representam as réplicas dos tratamentos.



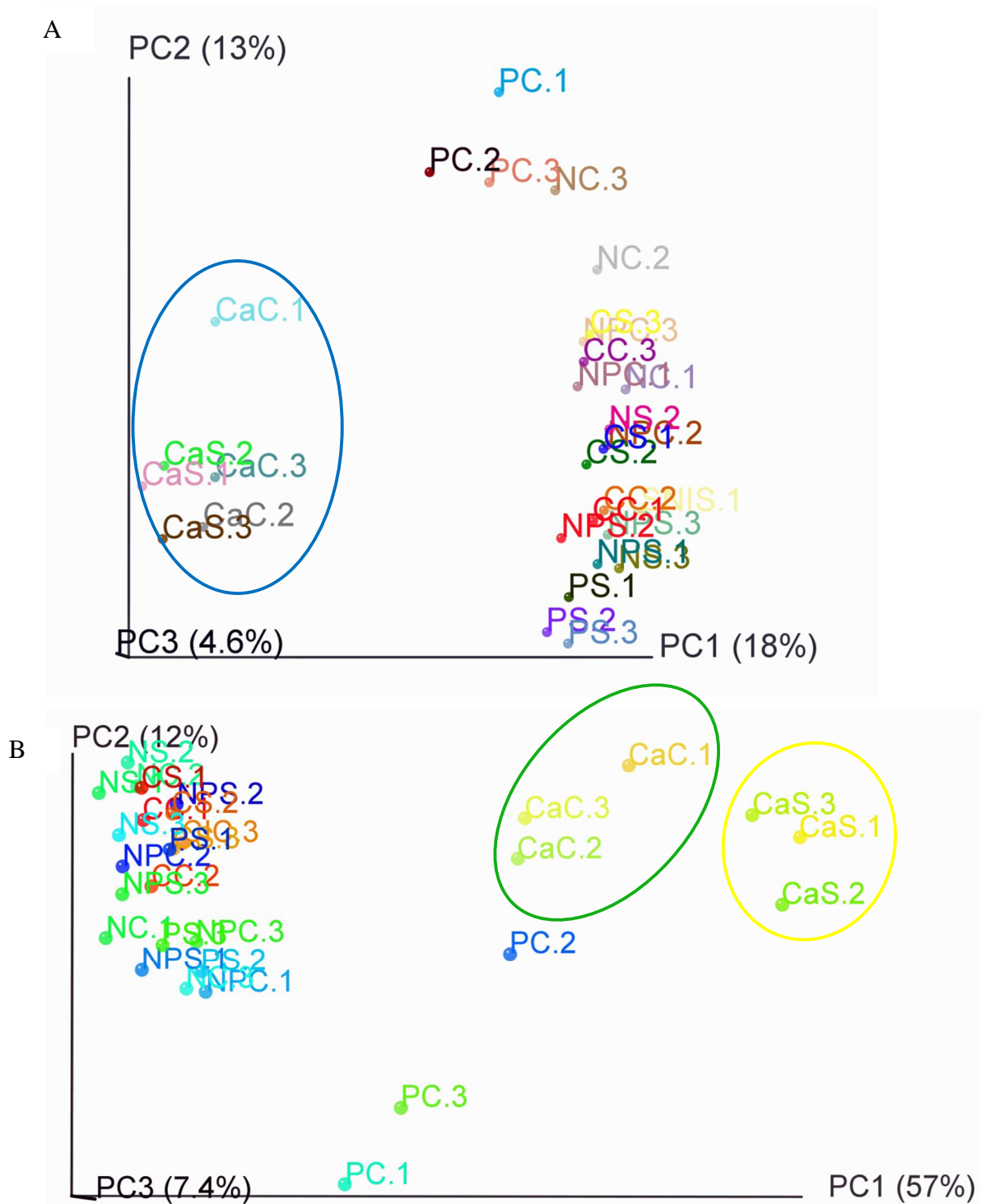


Figura 17. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) *unweighted* (A) e (B) *weighted* das sequências 16S rDNA do solo de áreas de cerrado sentido restrito submetidos à adição de nutrientes. Legenda: CC 1 a 3: parcelas de cerrado sentido restrito chuva; CS 1 a 3: parcelas de cerrado sentido restrito seca; CaC 1 a 3: parcelas cálcio chuva; CaS 1 a 3: parcelas cálcio seca; PC 1 a 3: parcelas fósforo chuva; PS 1 a 3: parcelas fósforo seca; NC 1 a 3: parcelas nitrogênio chuva; NS 1 a 3: parcelas nitrogênio seca; NPC 1 a 3: parcelas nitrogênio+fósforo chuva; NPS 1 a 3: parcelas nitrogênio+fósforo seca.

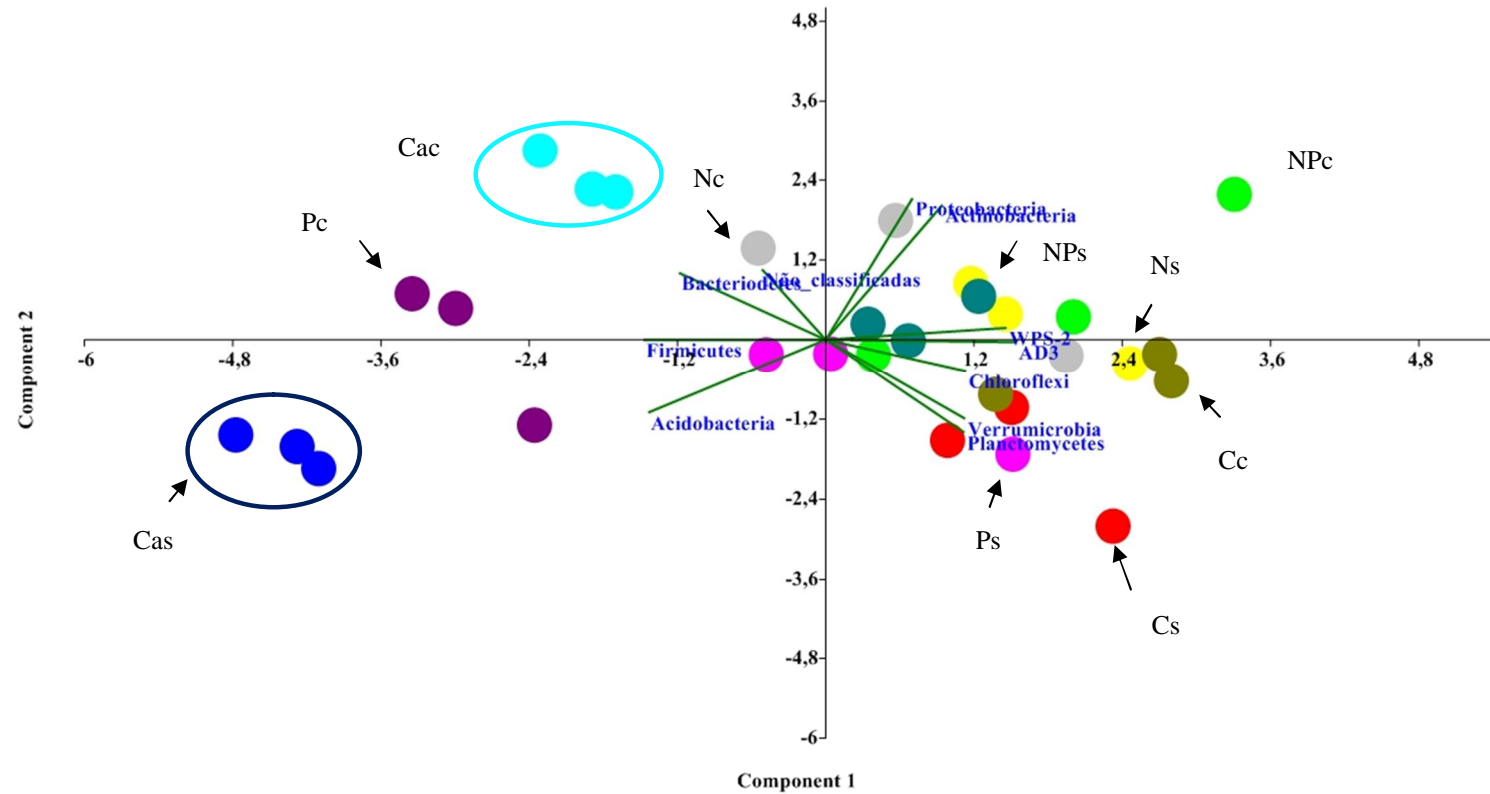


Figura 18. Análise dos componentes principais (PCA) com os filos abundantes dos solos analisados. Legenda: Cc -controle chuva; Cs - controle seca, Cac - cálcio chuva; Cas - cálcio seca; Pc - fósforo chuva; Ps - fósforo seca; Ns - nitrogênio seca; Nc - nitrogênio chuva; NPc - itrogênio+fósforo chuva; NPs - nitrogênio+fósforo seca.

#### 4. Discussão

As adições de nutrientes entre 1998 e 2006, induziram a alterações nas características químicas das parcelas dos diferentes tratamentos, incluindo alterações no pH e na disponibilidade de elementos (KOZOVITS *et al.*, 2007). Estudos conduzidos anteriormente nesta área, mostraram que o aumento na disponibilidade de nutrientes em um solo distrófico, levou a alterações na comunidade vegetal lenhosa e herbácea (JACOBSON *et al.*, 2010; BUSTAMANTE *et al.*, 2011) e como indicado neste estudo, também da comunidade bacteriana.

Maiores alterações devido à adição de nutrientes foram observadas no tratamento cálcio. Houve um aumento significativo no pH e nas concentrações de Mg,  $\text{N-NO}_3^-$  e  $\text{N-NH}_4^+$  e redução da concentração de alumínio. A calagem pode aumentar a mineralização de compostos orgânicos e o processo de nitrificação dos solos (ROSOLEM *et al.*, 2003). Tais alterações levaram à separação das parcelas do tratamento cálcio das parcelas dos demais tratamentos (Figura 18) pela análise de componentes principais.

Nos solos dos tratamentos analisados, encontramos membros dos principais filos bacterianos (filos Acidobacteria, Proteobacteria, Actinobacteria e Bacteroidetes). Esses quatro filos, de acordo com Bachar *et al.* (2010) estão presentes nos solos dos maiores biomas da Terra. Apesar de contraditório, distintos biomas abrigam comunidades bacterianas similares, podendo esta variação ser em grande parte explicada pelos valores de pH dos solos (BACHAR *et al.* 2010).

A riqueza de filos de bactérias foi semelhante entre os solos dos tratamentos analisados, com variações somente na abundância.

Em todos os tratamentos o filo Acidobacteria foi o mais abundante e seus membros estão entre os mais abundantes do solo. Sua distribuição é ampla, tendo sido encontrados nos mais diversos ambientes, entretanto seu cultivo e sua manutenção são difíceis em laboratório (EICHORST *et al.*, 2011). Esses fatores tornam pouco conhecidos sua diversidade e função no solo (JANSSEN, 2006).

Araújo *et al.* (2012) em trabalho realizado em solos de cerrado nativo encontraram também o filo Acidobacteria como mais abundante em quatro fitofisionomias de cerrado (cerrado denso, cerrado sentido restrito, campo sujo e mata de galeria). Apesar de sua dominância em todos os tratamentos, observou-se um aumento significativo dos filos Acidobacteria e Proteobacteria e do grupo de bactérias

não classificadas. A diminuição do filo AD3 e Verrumicrobia e a ausência total do filo WPS-2 foi observada no tratamento cálcio. Tais variações podem estar ligadas ao aumento de pH do solo. Mudanças na química do solo das áreas com acréscimo de cálcio podem afetar as plantas e a rizosfera destas, ocasionando alterações das funções microbianas dos ecossistemas (JUICE *et al.*, 2006).

Nas parcelas do tratamento fósforo verificou-se também o aumento dos filios Acidobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes e Planctomycetes e do grupo de bactérias não classificadas e a ausência total do filo WPS-2. Fósforo foi adicionado na forma de superfosfato simples (contém cálcio), entretanto não houve variações de pH em relação ao tratamento controle. As parcelas sob esse tratamento apresentaram uma maior disponibilidade de P, K em relação ao tratamento controle. Outro estudo indicou que os membros do filo Acidobacteria correlacionaram-se positivamente com o aumento da disponibilidade de fósforo e amônio, em solos de experimento de longa duração em Israel, representando três regiões climáticas: árido, semiárido e mediterrâneo (BACHAR *et al.* 2010).

A presença do filo Proteobacteria também foi detectada nos estudos de Quirino *et al.* (2009), Castro *et al.* (2011) e Araújo *et al.* (2012), que trabalharam com diversidade microbiana em solos do bioma cerrado. Segundo Mariano *et al.* (2004) podemos considerar as bactérias que compõem este filo como promotoras do crescimento vegetal. As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) fazem parte da população residente das plantas como epifíticas ou endofíticas e não são fitopatogênicas. Podem ser utilizadas para tratamento de sementes, mudas, incorporadas ao substrato de plantio, tratamento de estacas, tubérculos e raízes, pulverizações na parte aérea incluindo folhagem e frutos (MARIANO *et al.*, 2004).

O filo Proteobacteria é considerado o mais diversificado fenotipicamente entre os procariotos, onde se encontra a maioria das bactérias Gram ó negativas. Neste trabalho encontramos as classes Alpha, Beta, e Gammaproteobacteria. A classe Alphaproteobacteria apresentou maior abundância em todos os tratamentos e foi dominada por membros Rhizobiale; como o Betaproteobacteria e o Gammaproteobacteria por Proteobacterias não classificadas. O grupo Rhizobiale possui organismos fixadores de nitrogênio e geralmente estão associadas a raízes de gramíneas (ANDREOTE *et al.*, 2009).

A abundância de grupos de microrganismos de solo pode estar diretamente relacionada ao estado nutricional deste (SMIT *et al.*, 2009). Os resultados do trabalho

realizado em solos com plantação de trigo, antes e após adição de nutrientes, mostraram que solos com alta concentração de nutrientes disponíveis selecionaram o filo Proteobacteria, bactérias com altas taxas de crescimento. Em baixa concentração de nutrientes ou com alto teor de substratos recalcitrantes, o filo favorecido foi o de bactérias com menor capacidade de crescimento, mas com maior capacidade para competir por substratos, como Acidobacteria (SMIT *et al.*, 2009). Em comparação aos solos de Cerrado, neste trabalho e em outros realizados no bioma (QUIRINO *et al.*, 2009; CASTRO *et al.*, 2011; ARAÚJO *et al.*, 2012) podemos observar o mesmo padrão. Comunidades microbianas dos solos são diretamente afetadas pelo acréscimo de nutrientes, orgânicos ou não. Na presença de material vegetal facilmente degradável ocorre um favorecimento de microrganismos com taxa de crescimento alta, adaptados a ambientes com maior disponibilidade de nutrientes (MARSCHNER *et al.* 2003).

O tratamento nitrogênio promoveu o aumento dos filios Acidobacteria, AD3, Planctomycetes, Actinobacteria, Chloroflexi e Firmicutes. O aumento de nitrogênio no solo pode ter favorecido o aumento do filo Acidobacteria por este estar diretamente envolvido no ciclo do nitrogênio, reduzindo nitrato, nitrito e talvez, óxido nítrico (WARD *et al.*, 2009). Nitrogênio é um fator limitante para microrganismos de solo e a adição deste, pode modificar a biomassa microbiana, atividade e composição de espécies (SARATHCHANDRA *et al.*, 2001).

Em trabalho realizado com o objetivo de estudar o efeito da adição de N (125g N m<sup>-2</sup>) nas comunidades microbianas dos solos, Ramirez *et al.* (2012) incubaram solos coletados em 28 áreas dos Estados Unidos e verificaram que geralmente os filios Actinobacteria e Firmicutes aumentaram em abundância e os filios Acidobacteria e Verrucomicrobia diminuíram. Os autores sugerem que tais variações podem ser funções das altas taxas de metabolismo da comunidade em resposta ao acréscimo de nutriente.

Organismos pertencentes ao filo Firmicutes apresentam baixo teor de G + C e metabolismo caracterizado por homo e heterofermentação, assim, permitem que prevaleçam em ambientes com grande quantidade de nutrientes disponíveis e áreas com baixa competição, características típicas de microrganismos estrategistas R. Geralmente são encontrados em ambientes instáveis que estejam passando por transições (ATLAS & BARTHA, 1997).

Nas parcelas do tratamento nitrogênio observou-se somente aumento do filo Actinobacteria. O filo Actinobacteria representa uma das maiores unidades taxonômicas entre os filios bacterianos atualmente reconhecidos (STACKEBRANDT &

SCHUMANN, 2006). Estas bactérias Gram-positivas exibem uma grande variedade de formas e estão amplamente distribuídas, tanto em ambientes aquáticos quanto terrestres. As características deste filo ainda estão sendo estudadas, mas sabe-se que não respondem prontamente ao acréscimo de C ao solo e que são dependentes de Fe para seu crescimento (PEURA *et al.*, 2012; NAKOUTI *et al.* 2012). Para verificar o efeito da adição de nutrientes, Walkelin *et al.* (2012) adicionaram fósforo e nitrogênio ao solo em comunidades microbianas de solos de pastagens e puderam observar um aumento do filo Actinobacteria e de fungos arbusculares micorrízicos quando adicionado P e N. Vários estudos estão sendo realizados com o objetivo de analisar a capacidade de bactérias do filo Actinobacteria em fixar nitrogênio (GTARI *et al.*, 2012).

Nos tratamentos nitrogênio+fósforo houve um aumento da gramínea invasora *M. minutiflora* (BUSTAMANTE *et al.* 2012). Segundo Saraiva *et al.*(1993) o crescimento da gramínea *M. minutiflora* em solos de Cerrado tem seu crescimento limitado pela falta de P. Barger *et al.* (2003) em trabalho realizado com *M. minutiflora* em savanas venezuelanas mostraram que o crescimento é maior quando P é adicionado em conjunto com N. A colonização de áreas por espécies invasoras impacta os processos do ecossistema modificando a estrutura da vegetação, podendo modificar a composição e função da comunidade microbiana do solo. Algumas questões podem ser respondidas pelo aumento da deposição de material vegetal com concentrações de nutrientes diferentes e composição química diferentes da comunidade vegetal nativa, o que favoreceria determinados grupos, como os detritívoros (ZAK *et al.*, 2003).

Jacobson *et al.* (2011) verificaram em estudo realizado na mesma área experimental do presente estudo, mudanças na densidade, riqueza e diversidade de espécies lenhosas ocasionadas pelo acréscimo de nutrientes, sendo que os efeitos mais marcantes ocorreram com a aplicação de nitrogênio e fósforo. As taxas de decomposição da serapilheira foliar aumentaram nas parcelas dos tratamentos P e NP, onde se observou maiores concentrações iniciais de N, P e S. Com exceção dos nutrientes S (em todos os tratamentos fertilizados) e N (no tratamento N), a adição de N, P e NP ocasionou maior retenção dos nutrientes na serapilheira em relação ao observado nas parcelas controle. O aumento do filo Actinobacteria pode estar relacionado com o aumento de nutrientes da serapilheira, pois o filo está relacionado à degradação de lignina de amostras ambientais (TAYLOR *et al.*, 2012)

Com relação aos filos menos abundantes, observou-se um aumento da abundância dos filos TM6, TM7 nos tratamento cálcio, fósforo, nitrogênio e

nitrogênio+fósforo em relação ao tratamento controle. Os filamentos TM6 e TM7 pertencem aos filamentos de bactérias não cultiváveis, podendo ser encontrados em ambientes extremamente salinos (Yilmaz *et al.*, 2012), fato que não pode ser aplicado para solos de cerrado.

O filo Gemmatimonadetes aumentou em relação aos outros tratamentos nos tratamentos cálcio e fósforo. Segundo Debruyne *et al.* (2011), este filo apresenta maior distribuição em solos com pH próximo ao neutro, reforçando sua presença no tratamento cálcio (pH 6-6,8). Sridevi *et al.* (2012) mostraram que o filo apresenta maiores valores de abundância em solo com adição de cálcio. Pouco é conhecido sobre o filo Gemmatimonadetes, pois seu cultivo é difícil. No presente trabalho podemos observar a presença do filo no tratamento cálcio e fósforo, onde a adição de fósforo contém cálcio em sua fórmula. A interação entre os elementos pode estar favorecendo o estabelecimento do filo através das mudanças causadas na composição química do solo.

Por outro lado, ainda nas parcelas do tratamento cálcio, a abundância dos filamentos Armatimonadetes e Elusimicrobia diminuiu em relação ao tratamento controle e observou-se a ausência do filo BRC1. Os filamentos Armatimonadetes e Elusimicrobia são raros nos solos, podendo ser encontrados com maior abundância em regiões hipersalinas, estações de tratamento de águas. Segundo Elshahed *et al.* (2008) estes filamentos respondem às mudanças drásticas do ambiente.

O filo BRC1 foi anteriormente descrito na literatura como representante de solos com plantações de arroz inundado (Bacterial Rice Cluster 1) e sedimentos marinhos anóxicos. Seriam, portanto, anaeróbicos obrigatórios (DONACHIE *et al.*, 2004), condição raramente encontrada em solos de cerrado sentido restrito.

A abundância de todos os filamentos aumentou no tratamento fósforo em relação ao tratamento controle. Isso pode ser um indicador da limitação da comunidade microbiana por fósforo. Resultado semelhante foi observado com a adição de nitrogênio, com exceção do filo Gemmatimonadetes, que apresentou menor abundância nesse tratamento quando comparado ao tratamento controle. A baixa concentração de fósforo no solo de cerrado torna o elemento limitante (RESENDE *et al.*, 2011) tanto para as plantas quanto para os microrganismos. O fósforo é essencial para células, principalmente para a síntese de fosfolípidos, dos ácidos nucleicos e para seu metabolismo energético. A sazonalidade afeta a disponibilidade do P microbiano devido às variações de umidade do solo, causadas pelas estações seca e chuvosa (GRIERSON & ADAMS, 2000). Em trabalho realizado com o objetivo de quantificar os fluxos e estoques de P em uma área

de cerrado sentido restrito, Resende *et al.* (2011) verificaram que houve um aumento da concentração P microbiano no intervalo de 0-10 cm do solo na estação chuvosa. Salientaram que este pode ser um indicador de que plantas e microrganismos estão competindo pelo P disponível. A assimilação de P na estação de crescimento evita a perda por lixiviação e fixação química por óxidos de ferro e alumínio. Os microrganismos do solo desempenham papel fundamental no ciclo biogeoquímico do fósforo (P) e na sua disponibilidade para as plantas, mediante o fluxo de P pela biomassa microbiana, a solubilização do P inorgânico, a mineralização do P orgânico e a associação entre plantas e fungos micorrízicos (PAUL & CLARK, 1996). O P imobilizado na biomassa microbiana pode ser liberado através da ruptura das células microbianas, promovida por variações climáticas e de manejo de solo, e, também, por interações com a microfauna que, ao se alimentar de microrganismos, libera nutrientes no solo (BUCHANAN & KING, 1992). O fósforo contido na biomassa microbiana funciona, portanto, como uma proteção desse nutriente, diminuindo sua fixação por períodos prolongados em minerais do solo e aumentando a eficiência da adubação fosfatada pela imobilização de parte do P do fertilizante na biomassa (PAUL & CLARK, 1996).

Os mecanismos que mantêm a alta riqueza de microrganismos não estão claros ainda, mas a disponibilidade de água pode ser um importante fator que afeta a biomassa microbiana e a composição das comunidades no solo. A umidade do solo influencia diretamente a condição fisiológica bacteriana e pode limitar sua capacidade em decompor alguns compostos, como substratos orgânicos (HUESO *et al.*, 2012). Períodos com limitação de umidade podem induzir a competição por recursos provocando uma forte pressão seletiva na estrutura e funcionamento da comunidade bacteriana do solo (GRIFFITHS *et al.*, 2003).

Estudando comunidades microbianas em solos de Cerrado sob vegetação nativa submetida a queimadas prescritas e sob pastagem, Viana *et al.* (2011) verificaram um forte efeito da sazonalidade sob o perfil de ácidos graxos de fosfolípidos das comunidades microbianas. A queima da área nativa não apresentou uma diferenciação tão forte quanto o efeito da água e dos diferentes tipos de cobertura vegetal do solo, vegetação nativa e pastagem.

Desde o pioneiro trabalho de Birch (1958) sabemos que as diferenças de umidade no solo afetam os pulsos de mineralização de nutrientes e a respiração do solo. A resposta dos microrganismos a estas mudanças estão relacionadas a seu grupo



funcional. Quando a umidade do solo diminui, as condições se tornam mais favoráveis à fauna do solo e às bactérias do que aos fungos (FRECKMAN, 1986).

Existe um efeito da sazonalidade sob as comunidades bacterianas dos solos, com variações na abundância dos filos, entre as estações chuvosa e seca. Secas prolongadas podem representar um estresse significativo para os microrganismos do solo. A disponibilização de nutrientes após as primeiras chuvas seria um fator de estímulo para o retorno às atividades dos microrganismos (PLACELLA *et al.*, 2012).

Para a parcela controle, ocorreu um aumento nos filos Proteobacteria e AD3 na estação chuvosa. A maioria dos representantes do filo Proteobacteria responde rapidamente ao acréscimo de água (PLACELLA *et al.*, 2012). O filo AD3 tem sido identificado em solo rizosférico, solos de tundra, e solos com alto teor de umidade (HUR *et al.*, 2011). Na estação seca ocorreu um aumento nos filos Acidobacteria e Planctomycetes. O aumento do filo Acidobacteria é esperado, pois este é favorecido em condições extremas, entretanto o aumento do filo Planctomycetes é contrário ao encontrado na literatura (CAMPBELL *et al.*, 2011). Os tratamentos fósforo, nitrogênio e nitrogênio+fósforo apresentaram maiores valores para Planctomycetes na estação seca. O aumento do filo Acidobacteria encontrado para as parcelas controle foi encontrado também para o tratamento cálcio. Entretanto, a abundância de Planctomycetes não variou entre as estações.

A liberação de nutrientes após as primeiras chuvas estimula a competição entre comunidade bacteriana e plantas. Após um período de seca, com imobilização de nutrientes, os crescimentos das comunidades bacteriana e vegetal tendem a ser favorecidos com o acréscimo de água.

## 5. Conclusões

Em relações as hipóteses formuladas, os resultados obtidos permitem concluir que:

As comunidades bacterianas de solo diferiram entre os tratamentos de fertilização. Apesar da última adição de nutrientes ter ocorrido em 2006, às diferenças de disponibilidade de nutrientes no solo persistem e podem estar relacionadas à diferenciação das comunidades bacterianas. A partir das análises de pirosequenciamento dos fragmentos de 16S rDNA das amostras de DNA do solo com objetivo de caracterizar a comunidade bacteriana, verificou-se o aumento dos filos Acidobacteria, Verruimicrobia, Planctomycetes, Proteobacteria, nos tratamentos com adição de fósforo e cálcio. Já os filos Armatimonadetes e Elusimicrobia aumentaram no tratamento com adição de fósforo somente, mostrando que este elemento pode ser limitante para o estabelecimento destes dois filos.

Apesar de nitrogênio ser limitante em solos de Cerrado, a adição de nitrogênio e nitrogênio+fósforo não alterou significativamente a comunidade bacteriana do solo em relação às parcelas controle. Nestes três tratamentos, entretanto encontramos o filo WPS-2 que pode estar associado a condições de pH de solo mais ácido encontrados em solos de Cerrado. No tratamento com adição de cálcio, onde os valores de pH aumentaram este filo não foi identificado.

Analisando a interação entre sazonalidade e adição de nutrientes verificou-se que a redução do teor de umidade do solo na estação seca favoreceu o aumento dos filos Proteobacteria, Planctomycetes, Firmicutes, Armatimonadetes e Elusimicrobia em todos os tratamentos, exceto no cerrado controle. Esse resultado pode indicar que o efeito da redução de água não é tão marcante quando existem quantidades maiores de nutrientes disponíveis no solo.

## 6. Referências Bibliográficas

- ANDREOTE, F.D, CARNEIRO, R.T., SALLES, J.F., MARCON, J., LABATE, C.A., AZEVEDO, J.L., ARAÚJO, W.L. 2009. Culture-independent assessment of Rhizobiales- related Alphaproteobacteria and the diversity of *Methylobacterium* in the rhizoplane of transgenic eucaliptus. *Microbial Ecology* 57:82-93.
- ARAÚJO, J.F., CASTRO, A. P., COSTA, M.M.C., TOGAWA, R.C., PAPPAS, G.J., QUIRINO, B.F., BUSTAMANTE, M.M.C., WILLIAMSON, L., HANDELSMAN, J., KRÜGER, R. H. 2012. Characterization of soil bacterial assemblies in Brazilian savanna-like vegetation reveals Acidobacteria dominance. *Microbial Ecology* 64 [3]:760-770.
- ATLAS, R.M.; BARTHA, R. Microbial evolution and biodiversity: the origins of life.1997. In:(Ed.). Microbial ecology: fundamentals and applications.4th. ed. Menlo Park: Book News, p.37-39.
- AUSTIN, A.T.; YAHDJIAN, L.; STARK, J.M.; BELNAP, P.J.; PORPORATO, A.; NORTON, U.; RAVETTA, D.A.; SHAEFFER, S.M. 2004. Water pulses and biogeochemical cycles in arid and semiarid ecosystems. *Oecologia* 141:221-235.
- BACHAR, A., AL-ASHHAB, A., SOARES, M.I.M., SKLARZ, M. Y., ANGEL, R., UNGAR, E. D., GILLOR, O. 2010. Soil microbial abundance and diversity along a low precipitation gradient. *Microbial Ecology* 60:453-461.
- BARGER, N. N., DANTONIO, C.M., GHNEIM, T., CUEVAS, E. 2003. Constraints to colonization and growth of the African grass, *Melinis minutiflora*, in a Venezuelan savanna. *Plant Ecology* 167: 31643.
- BIRCH, H.F. 1958. The effect of soil drying on humus decomposition and nitrogen availability. *Plant and Soil* X, N° 1: 9-20.
- BOBBINK, R.K; HICKS,K; GALLOWAY, J; SPRANGER, T; ALKEMADE,R.; ASHMORE, M.; BUSTAMANTE, M.; CINDERBY, S., DAVIDOSN, E.; DENTENER, F.; EMMETT, B.; ERISMAN, J-W; FENN, M.; GILLIAM, F.; NORDIN, A.; PARDO, L.; DE VRIES, W. 2010 Global assessment of nitrogen deposition effects on terrestrial plant diversity: a synthesis. *Ecological Applications* Vol. 20, N° 1: 30-59.
- BRESOLIN, J.D., BUSTAMANTE, M.M.C, KRÜGER, R.H, SILVA , M.R.S.S, PEREZ, K.S. 2010 Structure and composition of bacterial and fungal community in soil under soybean monoculture in the Brazilian Cerrado. *Brazilian Journal Microbiology* 41: 391-403.
- BOUYOUCOS, G. J. 1926.Rapid determination of the moisture conten of soils. *Science* 64 [1670] :651-2.
- BUCHANAN, M.; KING, L.D. 1992. Seasonal fluctuations in soilmicrobial biomass carbon, phosphorus, and activity in no-till andreduced-chemical-input maize agroecosystems. *Biology and Fertility of Soils* 13:211-217.
- BUSTAMANTE, M.M.C.; BRITO, D.Q.; KOZOVITS, A. R.; LUEDEMANN, G.; MELLO, T.R.B.; PINTO, A.S.; MUNHOZ, C.R.R.; TAKAHASHI, F. 2012. Effects of nutrient additions on plant biomass and diversity of herbaceous-subshrub layer of a Brazilian savanna (Cerrado). *Plan Ecology* 213:795-808.
- CAMPBELL, G.N., KOZLOWSKI, J.A., PORET-PETERSON, A.T., STEIN, L.Y., KLOTZ, M.G. 2011. Model of the molecular basis for hydroxylamine oxidation andnitrous oxide production. *FEMS* 322 [1]: 82-89.
- CAPORASO, J.G; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BIITINGER, K.; BUSHMAN, F.D.; COSTELLO, E.K.; FIERER, N.; PEÑA, A.G.; GOODRICH, J.K.; GORDON, J.I.; HUTTLEY, G.A.; KELLEY, S.T.; KNIGHTS, D.; KOENIG,

- J.E.; LEY, R.E.; LOZUPONE, C.A.; MCDONALD, D.; MUEGGE, B.D.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J.R.; TURNBAUGH, P.J.; WALTERS, W.A.; WIDMANN, J.; YATSUNENKO, T.; ZANEVELD, J.; KNIGHT, R. 2010 QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 7 [5]:335-336.
- CASTRO, A.P.; QUIRINO, B.F.; ALLEN, H.; WILLIAMSON, L.L.; HANDELSMAN, J.; KRÜGER, R.K. 2011. Construction and validation of two metagenomic DNA libraries from Cerrado soil with clay content. *Biotechnology Letters* 33 [11]: 2169-2175.
- DAVET, P. 2004. Effect of environment on microorganisms p. 83-110. In: *Microbial Ecology of the Soil and Plant Growth*. Science Publishers, INC.
- DE VRIES, F.T.; HOFFLAND, E.; VAN EEKEREN, N.; BRUSSAARD, L.; BLOEM, J. 2006. Fungal/bacterial ratios in grasslands with contrasting nitrogen management. *Soil Biology & Biochemistry* 38: 2092-2103.
- DEBRUYN, J.M., NIXON, L.T., FAWAZ, M.N., JOHNSON, A.M., RADOSEVICH, M. 2011. Global biogeography and quantitative seasonal dynamics of *Gemmatimonadetes* in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 6295-6300.
- DONACHIE, S.P., HOU, S., LEE, K.S. 2004. The Hawaiian archipelago: a microbial diversity hotspot. *Microbial Ecology* 48, 509-520.
- EDGAR, R.C. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26 (19):2460-2461.
- EICHORST, S.A., KUSKE, C.R., SCHMIDT, T.M. 2011. Influence of plant polymers on the distribution and cultivation of bacteria in the phylum *Acidobacteria*. *Applied Environmental Microbiology* 77(2): 586-596.
- EITEN, G. 1972. The cerrado vegetation of Brazil. *Botanical Review* 38: 201-341.
- ELSHAHED, M.S., YOUSSEF, N.H., SPAIN, A.M., SHEIK, C., NAJAR, F.Z., ROE, B.A., DAVIS, J.P., SCHLOSS, P.D., BAILEY, V.L., KRUMHOLZ, L.R. 2008. Novelty and uniqueness patterns of rare members of soil biosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 74 [17]: 5422-5428.
- EMBRAPA- Centro Nacional de Pesquisa de Solos 1997. Manual de métodos de análise de solo/ Centro Nacional de Pesquisa de Solos. 2. ed. ver. Atual- Rio de Janeiro, 212p.
- FRECKMAN, D.W. 1986. The ecology of dehydration in soil organisms. A.C. Leopold (Ed.), *Membranes, Metabolism, and Dry Organisms*, Comstock Publ. Assoc, London, pp. 157-168.
- GRIERSON, P.F., COMEFORD, N.B., 2000. Non-destructive measurement of acid phosphatase activity in the rhizosphere using nitrocellulose membranes and image analysis. *Plant and Soil* 218: 49-57.
- GRIFFITHS, B.S, KUAN, H.L, RITZ, K., GLOVER, A.E, MCCAIG, A.E., FENWICK, C. 2004. The relationship between microbial community structure and functional stability, tested experimentally in an upland pasture soil. *Microbial Ecology* 47:104-113.
- GTARI, M., GHODHBANE-GTARI, F., NOUIOUI, I., BEAUCHEMIN, N., TISA, L.S. 2012 Phylogenetic perspectives of nitrogen-fixing actinobacteria. *Archives Microbiology* 194:3-11.
- HARIDASAN, M. 1994. Solos do Distrito Federal. p. 321-344. In: Novaes-Pinto M. (ed.) *Cerrado: Caracterização, ocupação e perspectivas* ó O caso do Distrito Federal. 2•ed. Editora da Universidade de Brasília/SEMATEC, Brasília. 681p.

- HUESO, S., GARCÍA, C., HERNÁNDEZ, T. 2012. Severe drought conditions modify the microbial community structure, size and activity in amended and unamended soils. *Soil Biology & Biochemistry* 50:167-173.
- HUR, M., KIM, Y., SONG, H-R., KIM, J.M., CHOI, Y.I., YI, H. 2011. Effect of genetically modified poplars on soil microbial communities during the phytoremediation of waste mine tailings. *Applied and Environmental Microbiology* 77 [21]:761167619.
- JACOBSON, T.K.B., BUSTAMANTE, M.M.C., KOZOVITS, A.R. 2010. Diversity of shrub tree layer, leaf litter decomposition and N release in a Brazilian Cerrado under N, P and N plus P additions. *Environmental Pollution* 159:2236-2242.
- JANSSEN, P.H. 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rDNA and 16S rDNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (3):1719-1728.
- JUICE, S.M., FAHEY, T.J., SICCAM, T.G., DRISCOLL, C.T., DENNY, E.G., EAGAR, C., CLEAVITT, N.L., MINOCHA, R., RICHARDSON, A.D. 2006. Response of sugar maple to calcium addition to northern hardwood forest. *Ecology* 87: 126761280.
- KAMEL, Z.; KHALIL, M.S.; SHALABY, A.M. 1989. Calcium and biological activities of two *Streptomyces* species isolated, from the rhizosphere of soybean plants. *Journal of Basic Microbiology* 29 (1): 31-39.
- KOZOVITS, A.R.; BUSTAMANTE, M.M.C.; GAROFALO, C.R.; BUCCI, S.; FRANCO A.C.; GOLDSTEIN, G.; MEINZER, F.C. 2007 Nutrient resorption and patterns of litter production and decomposition in a Neotropical Savanna. *Functional Ecology* 21[6]:103461043.
- LAIRD, N.M., WARE, J.H. 1982. Random-effects models for longitudinal data. *Biometrics* 38 [4]: 963-974.
- LOZUPONE C, KNIGHT, R. 2005. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied Environmental Microbiology* 71[12]: 8228-8235.
- MARIANO, R.L.R., SILVEIRA, E.B. 2004. Mancha-aquosa: importante bacteriose do meloeiro no Brasil. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica* 1:79-88.
- MARSCHNER, P., CROWLEY, D., YANG, C-H .2004. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant and Soil* 261: 1996208.
- MARULANDA, A., BAREA, J. M., AZCÓN, R. 2009. Stimulation of plant growth and drought tolerance by native microorganisms (AM fungi and bacteria) from dry environments: mechanisms related to bacterial effectiveness. *Journal of Plant Growth Regulation* 28: 115-124.
- MEIER, M. Nitratbestimmung in Boden-proden (N-min-Methode). Labor Praxis-abril: 244-247 p., 1991.
- NAKOUTI, I., SIHANONTH, P., HOBBS, G. 2012. A new approach to isolating siderophore-producing actinobacteria. *Letters in Applied Microbiology* 55: 68-72.
- PAUL, E.A.; CLARK, F E. 1997. *Soil microbiology and biochemistry*. Academic Press, San Diego, California. p.340.
- PEURA, S., EILER, A., HILTUNEN, M., NYKANEEN, H., TIROLA, M., JONES, R.I. 2012. Bacterial and phytoplankton responses to nutrient amendments in a boreal lake differ according to season and to taxonomic resolution. *PLoS ONE* 7(6): e38552. doi:10.1371/journal.pone.0038552

- PLACELLA, S., BRODIEB, E.L., FIRESTONE, M.K. 2012. Rainfall-induced carbon dioxide pulses result from sequential resuscitation of phylogenetically clustered microbial groups. *PNAS* 109 [27]: 10931610936
- PRICE, M.N, DEHAL P.S, ARKIN A.P. 2010. FastTree 2-approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS ONE* 5[3]: e9490. doi:10.1371/journal.pone.0009490
- QUIRINO, B.F; PAPPAS, G.J; TAGLIAFERRO, A.C; COLLEVATTI, R.G; NETO, E.L; DA SILVA, M.R; BUSTAMANTE, M.M; KRÜGER, R.H. 2009. Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with soil of the savanna-like Cerrado vegetation. *Microbiology Research* 164:59-70
- RAMIREZ, K.S., CRAINE, J., M., FIERER, N. 2012. Consistent effects of nitrogen amendments on soil microbial communities and process across biomes. *Global Change Biology* 18: 1918-1927.
- RESENDE, J., MARKEWITZ, D., KLINK, C.; BUSTAMANTE, M., DAVIDSON, E. 2010. Phosphorus cycling in a small watershed in the Brazilian Cerrado: impacts of frequent burning. *Biogeochemistry* 105:105-118.
- RINCÓN, L.S.; SAEZ, J.; GOMEZ, A.; PELLICER, C.; MADRID, R. 1998. Growth and nutrient absorption by muskmelon under greenhouse conditions. *Acta Horticulturae*, 458. In: International Symposium on Water Quality & Quantity-Greenhouse. 1: 416.
- ROSOLEM, C.A.; FOLONI, J.S.S., OLIVEIRA, R.H. de. 2003. Nitrogen dynamics in soil as affected by liming and nitrogen fertilization, with straw on the soil surface. *Pesquisa agropecuária Brasileira* 38 [2]: 301-309.
- SARATHCHANDRA, S.U., GHANI, A.A., YEATES, G.W., BURCH, G., COX, N.R. 2001. Effect of nitrogen and phosphate fertilizers on microbial and nematode diversity in pasture soils. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 953-964.
- SRIDEVI, G., MINOCHA, R., TURLAPATI, S. A., GOLDFARB, K.C., BRODIE, E.L., TISA, L.S., MINOCHA, S.C. 2012. Soil bacterial communities of a calcium-supplemented and a reference watershed at the Hubbard Brook Experimental Forest (HBEF), New Hampshire, USA. *FEMS Microbiology* 79: 728:740.
- STACKEBRANDT, E , SCHUMANN, P. 2006. Introduction to the Taxonomy of Actinobacteria. p. 297-321. Springer Verlag, New York, USA.
- TSAI, S.M. Efeitos de fatores físicos e químicos sobre os microrganismos do solo. 1992. In: Cardoso, E.J.B.N.; Tsai, S.M.; Neves, M.C.P. (eds). *Microbiologia do solo*. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p.59-72.
- VAN GESTEL, M., MERCKX, R., VLASSAK, K. 1993. Microbial biomass response to soil drying and rewetting: the fate of fast-and-slow-growing microorganisms in soils from different climates. *Soil Biology and Biochemistry* 25:109-123.
- VIANA, L.T., BUSTAMANTE, M.M.C., MOLINA, M., PINTO, A.S., KISSELLE, K., ZEPP, R, BURKE, R.A. 2011. Microbial communities in Cerrado soils under native vegetation subjected to prescribed fire and under pasture. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 46[12]: 1665-1672.
- WAKELIN, S., MANDER, C., GERARD, E., JANSÁ, J., ERB, A., YOUNG, S., CONDRON, L., O'CALLAGHAN, M. 2012. Response of soil microbial communities to contrasted histories of phosphorus fertilisation in pastures. *Applied Soil Ecology* 61:40648
- WARD, D.M. 1998. A natural species concept for prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology* 1 [3]: 271-277.

- WARDLE, D.A., PARKINSON, D. 1990. Interactions of microclimatic variables and the soil microbial biomass. *Biology and Fertility of Soils* 9:273-280.
- YILMAZ, P., IVERSEN, M.H., HANKELN, W., KOTTMANN, R., QUAST, C., GLOCKNER, F. 2012. Ecological structuring of bacterial and archaeal taxa in surface ocean waters. *FEMS Microbial Ecology* 81[2]:373-85
- ZAK, D.R., HOLMES, W.E., WHITE, D.C., PEACOCK, A.D., TILMAN, D. 2003. Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: are there any links. *Ecology* 84 [8]: 2042-2050.

## CAPÍTULO 2

### EFEITOS DA INVASÃO POR GRAMÍNEAS EXÓTICAS SOBRE AS COMUNIDADES BACTERIANAS EM SOLOS DE CERRADO

#### RESUMO

Mudanças nos ecossistemas decorrentes da conversão do uso da terra para cultivo ou devido às mudanças climáticas globais facilitam a entrada de espécies de plantas invasoras. O estabelecimento, naturalização e disseminação das espécies invasoras são os maiores responsáveis pelas mudanças na composição de espécies, estrutura da comunidade e principais funções nos ecossistemas naturais. As espécies invasoras podem levar a mudanças na comunidade bacteriana do solo, o que pode ser usado como um indicador das mudanças do funcionamento do solo. No bioma Cerrado, a gramínea africana *Melinis minutiflora* tornou-se um grande problema nas unidades de conservação. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a diversidade de microrganismos na rizosfera de *Echinochloa inflexa* (gramínea C3 nativa do Cerrado) e *Melinis minutiflora* (gramínea C4) a fim de analisar as mudanças na comunidade microbiana induzidas pela competição das duas espécies de gramíneas. Estas mudanças foram avaliadas em campo entre as estações chuvosa e seca e em um experimento conduzido com plantas envasadas em casa de vegetação. As amostras de solo relativas ao experimento em campo foram coletadas nos meses de agosto e dezembro de 2009, em área de cerrado nativo, localizada na Reserva Ecológica do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (RECOR/IBGE), em Brasília, DF. As amostras de solo relativas ao experimento em casa de vegetação foram coletadas após nove meses de crescimento da espécie nativa e seis da espécie invasora. As comunidades bacterianas foram analisadas através da extração de DNA seguida por PCR com amplificação dos genes 16S rDNA e DGGE (Eletroforese em gel de gradiente desnaturante). A distribuição e intensidade das bandas dos perfis de DGGE foram significativamente diferentes entre *E. inflexa* e *M. minutiflora*, o mesmo padrão sendo observado para as espécies em competição em vasos. A sazonalidade foi um fator adicional de diferenciação entre as estruturas das comunidades bacterianas quando coletadas em campo.



## ABSTRACT

Changes in ecosystems through land conversion for cultivation or because of global environmental changes facilitate the entry of invasive plant species. The establishment, naturalization and spread of invasive species are responsible for major changes in species composition, community structure and major functions of natural ecosystems. Invasive species could lead to changes in soil bacterial communities that could then be used as an indicator of changes in soil functioning. In Brazilian Cerrado, the African grass *Melinis minutiflora* became a major problem in conservation units. The purpose of this work was to characterize the diversity of microorganisms in the rhizosphere of *Echinolaena inflexa* (C3 native grass from Cerrado) and *Melinis minutiflora* (C4 species) in order to analyze changes in microbial community induced by the competition between the two grass species in the field, during wet and dry seasons and in an experiment with plants in a greenhouse. Soil samples from the rhizosphere were collected in from August 2009 and December 2009 in a native Cerrado area, located at Reserva Ecológica do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (RECOR/IBGE), in Brasília, DF, Brasil. Soil samples for the greenhouse experiment were collected after nine months of growth for native species and six months for exotic species. Bacterial communities were analysed using DNA extraction followed by PCR amplification of 16S rDNA genes and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) analysis. The distribution and intensity of bands from DGGE profiles were significantly different between *E. inflexa* and *M. minutiflora* rhizosphere, but the same as when the species were in competition experiments. Seasonality was an additional factor differentiating bacterial communities structures from the samples collected in a natural system.

## 1. INTRODUÇÃO

O Cerrado possui em sua paisagem um mosaico de diferentes tipos de vegetação com um gradiente de densidade de plantas lenhosas (EITEN, 1972) e farto estrato herbáceo gramíneo (COUTINHO, 2006). Segundo Filgueiras (1992), em levantamento realizado no Distrito Federal, foram identificadas 134 espécies de gramíneas forrageiras.

A retirada da vegetação de Cerrado para o estabelecimento de áreas de cultivo e pastagens estão causando grandes perdas à biodiversidade do bioma. Além do desmatamento, outra ameaça à biodiversidade do cerrado é a invasão biológica, onde espécies exóticas com alta capacidade competitiva podem dominar e extinguir as espécies nativas (PIVELLO, 2011).

Gramíneas africanas para o estabelecimento de pastagens devido sua fácil adaptação e semelhanças ecológicas de seus habitats de origem (savanas africanas) foram amplamente utilizadas na região do Brasil Central.

A espécie africana *Melinis minutiflora* (espécie C<sub>4</sub>), popularmente conhecida como capim-gordura, é uma das principais espécies invasoras e, devido ao seu potencial invasor, tem se tornado um grande problema em Unidades de Conservação (PIVELLO *et al.* 1999a; 1999b). Competindo com as gramíneas nativas como *Echinolaena inflexa* (gramínea C<sub>3</sub>), o capim-gordura é capaz de invadir áreas naturais e de descaracterizar em poucos anos a fisionomia da vegetação original (FILGUEIRAS, 1990).

As áreas de alta vulnerabilidade à invasão por *M. minutiflora* se encontram principalmente nas regiões de vegetação mais aberta do parque estadual de Vassanunga (Sta. Rita do Passo Quatro, SP), ocupadas pelas formações de campos e algumas áreas de cerrado *sensu stricto* menos denso segundo mapeamentos de Bittencourt & Mesquita Jr. (2005), podendo indicar que essa espécie seja menos tolerante a áreas mais fechadas.

Alguns estudos têm caracterizado a biologia e a ecologia de espécies invasoras, a dinâmica de suas populações, seu controle ou erradicação e recuperação das áreas invadidas em áreas protegidas no Brasil (MOROSONI & KLINK, 1997; FREITAS, 1999; PIVELLO *et al.*, 1999a). Entretanto, poucos trabalhos foram encontrados com objetivo de verificar o efeito de espécies invasoras de gramíneas sobre a microbiota do solo em ecossistemas brasileiros.

Os microrganismos de solo e sua atividade podem ser afetados pela mudança na qualidade do substrato, quantidade e condições ambientais. Estas condições estão diretamente relacionadas ao conteúdo de matéria orgânica do solo (VANCE &

NADKARNI, 1990). A colonização de áreas por espécies invasoras alteraria a comunidade por modificar as condições do solo estabelecidas pelas espécies nativas. Saraiva (1993) observou que capim-gordura, em Latossolo Vermelho, é limitado por P e Ca e responde bem às adubações com fósforo e nitrogênio. Fósforo é limitante tanto para capim-gordura quanto para os microrganismos do solo, entretanto, os microrganismos por terem alta afinidade por diversos substratos, rápida taxa de crescimento, e elevada razão superfície: volume seriam melhores competidores que as plantas por recursos limitantes (CLEVELAND *et al.*, 2002). Gramíneas exóticas no Havaí alteraram a ciclagem de N no solo. Esta alteração incluiu modificações químicas na composição da matéria orgânica, umidade e temperatura do solo (MACK, 2003).

O mecanismo das invasões por espécies exóticas foi estudado por Callaway & Aschehoug (2000), com o objetivo de verificar as interações entre os novos e os velhos vizinhos. Os autores compararam os efeitos de espécie invasora eurásiana *Centaurea diffusa* com três espécies que coexistem com ela na Eurásia e os efeitos de *Centaurea diffusa* com três espécies da América do Norte, com morfologia e tamanho similares. A espécie *Centaurea diffusa* apresentou efeitos negativos mais evidentes nas espécies da América do Norte. Os resultados indicaram que algumas espécies exóticas invasoras podem usar mecanismos que não estão aparentes em seu ambiente natural. A alelopatia química poderia estar sendo usada como mecanismo pelas plantas invasoras para eliminar as nativas, sugeriram os autores. Os exsudatos das raízes de *Centaurea diffusa* afetaram a rizosfera das espécies nativas da América do Norte, diminuindo sua diversidade microbiana (CALLAWAY & ASCHEHOUG, 2000).

A rizosfera exerce uma seleção sobre a comunidade microbiana ao seu redor, através da liberação de aminoácidos, enzimas, vitaminas e proteínas necessárias para a comunidade microbiana. A natureza e a abundância do material liberado pela rizosfera, denominado de rizodeposição, irá depender da planta e de seu estágio de desenvolvimento. A rizodeposição pode ser afetada por eventos capazes de modificar o funcionamento da planta, como modificações na intensidade de luz, temperatura, disponibilidade de água, deficiência de minerais, fitotoxicidade e redução da área foliar (DAVET, 2004).

As interações entre espécies vegetais nativas e exóticas podem influenciar assim a microbiota. Wardle & Nicholson (1996) avaliaram os efeitos sinérgicos entre espécies de gramíneas e atividade da biomassa microbiana no solo em experimento conduzido em casa de vegetação, com as espécies plantadas em vasos. *Lolium perenne* e mais nove

espécies de gramíneas foram misturadas. As espécies também foram mantidas em cultivos individuais para controle do experimento. Os resultados mostraram que a biomassa microbiana não foi afetada significativamente pela mistura entre as espécies, mas que a biomassa de saprófitos aumentou induzida pelo aumento da diversidade de plantas. A competição entre as espécies de plantas não influenciou negativamente a biomassa microbiana, promovendo um aumento da biodiversidade.

Avaliando as respostas observadas do efeito da gramínea invasora *M. minutiflora* em áreas nativas de cerrado, afetando a diversidade da vegetação e competindo com a gramínea nativa, *E. inflexa*, coloca-se a pergunta se a comunidade bacteriana de solo também é afetada em termos de diversidade com a interação entre *E. inflexa* e *M. minutiflora*. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivos:

1. Caracterizar a diversidade de bacteriana na rizosfera de *Echinolaena inflexa* (capim-flexinha), gramínea C<sub>3</sub> nativa do Cerrado e *Melinis minutiflora* (capim-gordura), espécie C<sub>4</sub> de origem africana e invasora em áreas nativas de Cerrado, através da coleta de amostras de solo em campo;
2. Verificar as alterações na comunidade microbiana induzidas pela interação entre as duas espécies de gramíneas (nativa e exótica), através de experimento em vasos em casa de vegetação.

A seguinte hipótese foi formulada:

As espécies de gramíneas invasoras afetam a diversidade da microbiota do solo em áreas nativas de cerrado em função de diferenças no investimento em biomassa radicular e no padrão de absorção e uso de nutrientes que implicam em diferenças na produção de exsudatos radiculares e alterações na química de solos e em processos de ciclagem de nutrientes.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Estudo em condição de campo**

#### **2.1.1. Área de estudo**

A área de estudo localiza-se na Reserva Ecológica do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (RECOR / IBGE), localizada a 35 km ao sul do centro de Brasília, D. F., km 0 da BR 251 (15° 55' S, 47° 51' W), a uma altitude média de 1100 m, ocupando uma área de 1350 ha. O clima, segundo a classificação de Köppen, é tropical (Aw), com precipitação anual média entre 1100 a 1600 mm com duas estações bem definidas: seca e chuvosa. A estação seca ocorre de maio a setembro e a chuvosa de outubro a abril, quando ocorre mais de 90% da precipitação anual.

A vegetação da área de estudo é caracterizada como cerrado sentido restrito, formação fisionômica vegetal que caracteriza os cerrados do Brasil Central, ocupando aproximadamente 43% da região (EITEN, 1972). Já o solo da área é classificado como Latossolo Vermelho (distróficos, profundos e bem drenados e com minerais argilosos do tipo 1:1 com predomínio de óxidos de ferro e alumínio) (HARIDASAN, 1994).

#### **2.1.2. Coleta das amostras de solo**

As plantas de *Echinolaena inflexa* e *Melinis minutiflora* foram coletadas em área de cerrado sentido restrito, dentro da Reserva Ecológica do IBGE, em locais onde havia invasão de *M. minutiflora*, próxima ao local onde está estabelecido o projeto de fertilização. As coletas foram realizadas na estação seca (agosto de 2009) e na estação chuvosa (dezembro de 2009). Para cada espécie foram coletadas três touceiras de gramíneas por estação.

Para as coletas de solo retiraram-se touceiras de *E. inflexa* (capim flexinha) e *M. minutiflora* (capim-gordura), cortando-se o solo em volta da planta e armazenando-os em sacos plásticos, mantidos em gelo, para coleta de solo rizosférico em laboratório.

## 2.2. Experimento com plantas envasadas em casa de vegetação

O estudo foi conduzido em casa de vegetação na Estação Experimental de Biologia da Universidade de Brasília, em Brasília óDF (15°44'14" S e 47°52'52" W). Foram utilizadas as mesmas espécies de gramíneas que foram coletadas em campo (Figura 19).

O experimento teve como objetivo simular uma invasão de *M. minutiflora* através da germinação de sementes em uma área já colonizada por *E. inflexa*. Dessa forma, coletamos perfilhos de *E. inflexa*, na Reserva Ecológica do IBGE ó RECOR.

Este experimento monitorou os efeitos da interação entre as plantas na comunidade microbiana, bem como os efeitos da competição no crescimento dos indivíduos. Para monitorarmos os efeitos das gramíneas na comunidade microbiana, consideramos dois momentos: o tempo inicial (Ti), onde a gramínea *E. inflexa* estava plantada há um mês e as sementes de *M. minutiflora* distribuídas nos vasos e o tempo final (Tf) ao final do experimento, onde a espécie nativa estava estabelecida há nove meses e a invasora totalizando oito meses.

Os indivíduos foram coletados por meio da retirada de blocos de solo, na tentativa de preservar ao máximo o sistema radicular e colocados em caixas plásticas. Estes permaneceram nas caixas por um período de dez dias, recebendo água em dias alternados. Este período foi estabelecido para evitar um estresse maior às plantas. Em 18/03/2010, os perfilhos foram transplantados para vasos plásticos de nove litros contendo mistura de solo e areia na proporção de 2:1 (5 kg por vaso) e uma camada de brita ao fundo, para facilitar escoamento de água e evitar perda de substrato.

Foram montados nove vasos por tratamento, distribuídos da seguinte forma: monoculturas de *M. minutiflora* e *E. inflexa* (vasos õmonoculturaö) e interação entre as duas espécies (vasos õinteraçãoö). Nove vasos foram deixados somente com solo para controle do experimento. Entre os nove vasos, foram escolhidos aleatoriamente, três vasos por tratamento para coleta das amostras. A gramínea africana foi semeada em 07/04/2010 e o experimento foi desmontado em 10/12/2010, totalizando nove meses de crescimento para a espécie nativa e oito para a invasora.

Os vasos permaneceram em casa de vegetação com duas irrigações diárias, uma no período da manhã e outra no período da tarde. Estes foram rotacionados de forma aleatória a cada dois dias para excluir a possível variação na distribuição de água e luminosidade. Todos os vasos foram acrescidos de solução nutritiva de Hoagland (1/3

da força, 12,5 mL de solução por vaso). A solução foi aplicada três vezes com intervalos de 15 e 30 dias da primeira aplicação. A primeira aplicação para *E. inflexa* foi um mês após o plantio e para *M. minutiflora* depois de um mês após a germinação das sementes.

Ao término do experimento, os vasos foram desmontados para retirada das plantas e do solo. O solo foi separado em solo rizosférico, aderido às raízes e solo total, restante do solo dos vasos. Importante observar que quando em interação, no tempo Tf (tempo final), as raízes das gramíneas *E. inflexa* e *M. minutiflora* estavam entrelaçadas. Foram desmontados doze vasos por tempo, Ti e Tf.

Em cada vaso, os indivíduos foram separados entre si e divididos em parte aérea e sistema radicular. As raízes foram armazenadas em sacos plásticos contendo um pouco de água destilada e mantidas em refrigeração. A parte aérea teve seu comprimento medido pela maior projeção de cada vaso e também foi mantida refrigerada.

O sistema radicular foi digitalizado com um Scanner Epson Perfection V700 e as imagens digitalizadas, analisadas com o programa WinRhizo® e classificadas em classes diamétricas com intervalos de 0,5 mm, sendo classificadas como raízes finas aquelas com diâmetro menor que 0,5 mm.

Os seguintes parâmetros foram avaliados pelo programa: Comprimento Total de Raízes (CTR), Comprimento de Raízes Finas (CRF), Projeção de Área Total alcançada pelas raízes (PAT) e Superfície Total de Raízes (ST) em contato com o solo.

Relações entre esses parâmetros foram calculadas para facilitar comparações e a discussão dos resultados, como Comprimento de Raízes Finas/Comprimento Total de Raízes (RFT), Biomassa de Raízes/Biomassa Parte Aérea (RBB), Comprimento Total de Raízes/Comprimento da Parte Aérea (RCC), Comprimento Total de Raízes/Biomassa das Raízes (RCBR), Comprimento da Parte Aérea/Biomassa da Parte Aérea (RCBPA).

Ao chegar ao laboratório, as amostras de solo destinadas às análises moleculares foram peneiradas através de malha de 2 mm, fracionadas em pequenas quantidades e congeladas em freezer -20°C. As amostras utilizadas para determinação de pH e análise de nutrientes foram peneiradas, secas em temperatura ambiente e armazenadas para as análises. Para determinação do conteúdo gravimétrico, as amostras foram acondicionadas em latas de alumínio e vedadas.



Figura 19. Experimento conduzido em casa de vegetação com plantas envasadas das espécies *Echinolaena inflexa* (nativa) e *Melinis minutiflora* (invasora).



### **2.3. Análises físico-químicas de solo**

Os valores de pH do solo foram obtidos em água destilada e CaCl<sub>2</sub> (0,01M) na proporção 1:2,5. Após agitação com bastão de vidro e repouso por 30 minutos foi realizada a leitura do pH com auxílio de um potenciômetro.

O teor gravimétrico de água no solo foi determinado pela diferença entre o peso fresco e o peso seco do solo, após ter sido mantido em estufa a 105° C até peso constante.

Somente uma amostra de solo rizosférico por espécie e por estação foi analisada para nutrientes. Por este motivo, não existem valores médios nem desvio padrão para tais análises. Somente os dados de pH e conteúdo gravimétrico foram realizados em triplicata. Para as análises de nutrientes dos solos do experimento com vasos, enviamos as amostras referentes ao tempo Tf (tempo final), com uma amostra por tratamento.

As análises químicas do solo foram realizadas pelo laboratório de Solos Florestais da Universidade Federal de Viçosa (UFV-MG). Os elementos P, K foram extraídos com o extrator Mehlich1 e os elementos Ca, Mg e Al com o extrator KCl (1mol/L). O carbono orgânico foi determinado pelo método Walkley-Black. A concentração de P disponível foi determinada por colorimetria, K trocável por fotometria de chama, Ca e Mg trocáveis por espectrofotometria de absorção atômica. O elemento Al por titulometria. As análises realizadas seguiram o protocolo estabelecido por EMBRAPA (1997).

A análise de textura das amostras de solo foi realizada com o método do densímetro (BOUYOUCOS, 1926).

### **2.4. Análises da comunidade bacteriana de solo**

Para as amostras de solo coletadas das rizosferas de *E. inflexa* e *M. minutiflora* em situação de campo realizou-se três extrações de DNA para obter triplicata técnica das amostras dos três conjuntos de touceiras de cada espécie. Tal procedimento foi realizado com amostras das duas estações (seca e chuvosa).

Para o experimento em casa de vegetação realizou-se extração de DNA para as amostras de todos os vasos do tempo inicial (Ti) e tempo final (Tf), com três repetições para cada tratamento: *E. inflexa*, *M. minutiflora*, interação *E. inflexa* e *M. minutiflora* e vasos sem gramíneas (solo).

A extração de DNA total das amostras de solo foi feita através do kit FastDNA SPIN para extração de DNA de microrganismos em amostra de solo, marca MP Bio, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante, com uso do equipamento Fast Prep<sup>®</sup> 24 (MP Bio, USA). O produto da extração foi avaliado por eletroforese em gel de agarose 0,8 % contendo brometo de etídeo (2 g/ml) e o seu tamanho estimado por comparação com o marcador 1kb *plus ladder* (USB-EUA).

As reações de PCR foram feitas com um volume total de 50 µl utilizando-se tampão da *Taq* polimerase com concentração final 1X, 1,5 U de *Taq* DNA polimerase 0,25 mM de dNTPs, 5 pmol para ambos os *primers*, forward e reverse. Para amplificação das amostras, foram usados os primers universais 968F (5' CgCCCgCCgCgCgCgCggCgggCggggCgggggCACggggggAACgCgAAgAACCTTAC3') e 1401R (5'gCgTgTgTACAAgACCC3') (Invitrogen<sup>®</sup>). Grampos GC foram adicionados aos *primers* forward (F). O acréscimo dos grampos deve-se ao fato de podermos aumentar a detecção nas porcentagens de variação de sequências em fragmentos de DNA com até 500 pares de base. Quando o grampo GC é anexado à extremidade 5' de um dos iniciadores, é amplificado por PCR junto com o DNA e introduzido ao fragmento amplificado age como um domínio de alta temperatura de desnaturação, impedindo a dissociação das duas fitas de DNA (MUYZER *et al.*, 1998).

Para amplificação por PCR foi usada o termociclador Veriti 384 (Applied Biosystems). Para os *primers* 968F e 1401R, utilizou-se o seguinte programa para as reações: 3 minutos de desnaturação inicial a 94°C, seguidos de 36 ciclos de desnaturação de 1 minuto a 94°C, anelamento (1 minuto a 58°C), extensão (1 minuto a 72°C), seguido por 10 minutos de extensão final a 72°C.

Para todas as reações de PCR foi feito um controle negativo, onde não se acrescentou amostra de DNA, para verificação de contaminação das reações. Para visualização dos produtos, foi feito um gel de agarose 1%, com 5 µl de amostra, adicionado a 5 µl de corante de amostra e 10 µl de marcador molecular de 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen<sup>®</sup>), com duração de corrida entre 30-40 minutos a 100V. Após coloração com solução de brometo de etídeo (2µg / mL) por 20 minutos e descoloração em água destilada, por mesmo período, o gel foi fotografado imediatamente.

Perfis da comunidade microbiana foram avaliados através da técnica de PCR/DGGE (Muyzer 1999). Foram testados *primers* universais para bactérias,

amplificação da sequência de 16S rDNA. Os géis de DGGE foram analisados através do programa BIONUMERICS (Applied Maths).

As corridas dos géis de DGGE foram realizadas no laboratório de Enzimologia da Universidade de Brasília.

Os géis de poliacrilamida a 8% (w/v) foram feitos com um gradiente de desnaturação entre 40 e 70% (uréia-formamida), e os produtos de PCR foram aplicados na quantidade de 25  $\mu$ l adicionados a 20  $\mu$ l de corante (2% de azul de bromofenol, 2% de xileno cianol, glicerol 100%, água Milli-Q).

A corrida do gel de DGGE foi feita usando-se o sistema de eletroforese vertical Bio-Rad Dcode Dcode<sup>TM</sup> Universal Mutation Detection (fonte Bio-Rad Power Pac 1000) com voltagem constante de 75V e temperatura de 55°C por um período de 16 horas em tampão 0,5X TAE. Uma pré-corrida de 1 hora foi realizada com os mesmos parâmetros para uma limpeza inicial do gel. Após a corrida, os géis foram corados com brometo de etídeo (2 $\mu$ g/mL) por 20 minutos. Posteriormente, os géis foram descorados em água destilada por igual período. As bandas foram visualizadas em transiluminador U.V. (Alpha Innotech) com posterior fotografia do gel. O programa usado para visualização dos géis foi Alphaview.

## **2.5. Análises estatísticas**

Os dados relativos às análises de solo, como pH, teor gravimétrico e nutrientes foram testados quanto à sua normalidade e homocedacidade. Tais verificações foram feitas através das análises dos gráficos de resíduos gerados (LAIRD & WARE, 1982)

Após o teste Shapiro-Wilk realizou-se uma ANOVA seguida por teste de Tukey para as comparações dos dados de arquitetura e biomassa de raízes.

Diferenças em nível de 5 % de probabilidade foram consideradas significativas. As análises estatísticas foram realizadas no programa R (versão 2.13.0, pacote NLME 2.13.2 - R *Development Core Team* 2008).

Os géis de DGGE foram analisados através do programa BIONUMERICS (Applied Biosystems) e os dendrogramas foram gerados utilizando o algoritmo UPGMA, com coeficiente de similaridade de DICE.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Amostragens em condição de campo

##### 3.1.1. Características físico-químicas dos solos

O conteúdo gravimétrico de água das amostras de solo da rizosfera de *E. inflexa* e *M. minutiflora* nos meses de agosto de 2009 (estação seca) e dezembro de 2009 (estação chuvosa) respondeu às variações da precipitação nos períodos amostrados. No mês de agosto, até a data da coleta das amostras de solo (11/08/2009), a precipitação acumulada no mês foi de 0 mm. Para o mês de dezembro, até a data da coleta das amostras de solo (15/12/2009), a precipitação acumulada no mês foi de 120,7 mm. Os valores encontrados para o solo rizosférico de *E. inflexa* foram 20% e 40%, nas estações seca e chuvosa e 21% e 45%, nas estações seca e chuvosa para *M. minutiflora*. Diferenças significativas no conteúdo gravimétrico da rizosfera de *E. inflexa* e *M. minutiflora* foram detectadas somente na estação chuvosa (Tabela 1).

Os valores de pH da rizosfera de *E. inflexa* foram significativamente maiores que os da rizosfera de *M. minutiflora* nas duas estações estudadas (Tabela 1), onde foram observadas também, diferenças sazonais. O valor de pH (H<sub>2</sub>O) do solo da rizosfera de *E. inflexa* diferiu significativamente entre as estações, sendo maior na estação chuvosa (4,56) que na seca (4,14). Igualmente, no solo da rizosfera de *M. minutiflora* o valor de pH foi maior na estação chuvosa (4,10) que na seca (3,80).

As concentrações de P, K, Ca e Mg disponível na rizosfera de *M. minutiflora* foram significativamente maiores que na rizosfera de *E. inflexa*. A capacidade de troca catiônica (CTC) (Tabela 1) 4,28 cmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup> a 7,0 cmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup> e matéria orgânica foram também significativamente maiores na rizosfera *M. minutiflora* com valores entre 54,8 g/kg a 104,3 g/kg.

Contrariamente, a concentração de Al disponível na rizosfera de *E. inflexa* foi maior que na rizosfera de *M. minutiflora* (valores entre 0,39 cmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup> e 1,17 cmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup>) (Tabela 1).

Tabela 1: Características físico-químicas dos solos da rizosfera de *E. inflexa* e *M. minutiflora* nos meses de agosto e dezembro de 2009 (estação seca e chuvosa, respectivamente) na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, DF.

		<i>E. inflexa</i>	<i>M. minutiflora</i>
P (mg/dm <sup>3</sup> )	Estação seca	0,5 Bb	1,4Aa
	Estação Chuvosa	1,2 Aa	1,5Aa
K (mg/dm <sup>3</sup> )	Estação seca	16Bd	132Aa
	Estação Chuvosa	37Bc	52Ab
Ca <sup>2+</sup> (mg/dm <sup>3</sup> )	Estação seca	0,16Bc	2,5Aa
	Estação Chuvosa	0,66Bb	6,0A
Mg <sup>2+</sup> (cmol <sub>e</sub> /dm <sup>3</sup> )	Estação seca	0,1Bc	1,44A
	Estação Chuvosa	0,36Bb	0,9Aa
Al <sup>3+</sup> (cmol <sub>e</sub> /dm <sup>3</sup> )	Estação seca	0,39Aa	0Bb
	Estação Chuvosa	1,17A	0Bb
CTC (cmol <sub>e</sub> /dm <sup>3</sup> )	Estação seca	0,69Bc	4,28Aa
	Estação Chuvosa	2,28Ab	7,0A
MO (g/kg)	Estação seca	48,3Bb	54,8Aa
	Estação Chuvosa	83,5B	104,3A
pH (H <sub>2</sub> O)	Estação seca	4,14±0,02Aa	3,80±0,02B
	Estação Chuvosa	4,56±0,01A	4,10±0,01Aa
Teor gravimétrico (%)	Estação seca	20,0±0,09Aa	21,0±0,7Aa
	Estação Chuvosa	40,3±0,03B	45,0±0,01A
Textura		Argilosa	Argilosa

Valores e médias seguidos de mesma letra maiúscula, na linha, e minúscula, na coluna, não diferem significativamente (p<0,05).

### 3.1.2. Análises da comunidade bacteriana do solo

O DNA de solo obtido através das extrações apresentou pureza e quantidade suficientes para a realização de PCR, após a visualização em gel de agarose a 0,8%. Após a realização da PCR, os produtos foram visualizados em gel de agarose a 1% para posterior aplicação nos géis de DGGE.

O resultado dos géis de DGGE (em triplicata) está apresentado nas figuras 20, 21 e 22. Foi possível observar nos três géis um padrão de agrupamento bem similar entre as réplicas dos géis.

As amostras de *E. inflexa* e *M. minutiflora* separam-se claramente em dois grupos com 40% de similaridade. Já entre os dois grupos de amostras, a principal separação ocorreu entre as estações, chuvosa e seca.

As amostras de solo rizosférico de *E. inflexa* na estação seca agruparam-se com 70% de similaridade. As amostras da estação chuvosa formaram dois grupos, o primeiro com 80% de similaridade e o outro com 40%. Uma das repetições referente à estação chuvosa se agrupou com as amostras da estação seca.

Podemos observar o mesmo padrão de agrupamento para as amostras de *M. minutiflora*, onde as amostras obtidas nas estações seca e chuvosa formaram dois grupos com 20% de similaridade. Duas amostras referentes à estação seca agruparam-se a 50%. A terceira repetição agrupou-se a 20%. Esta amostra formou um grupo com as amostras da estação chuvosa.

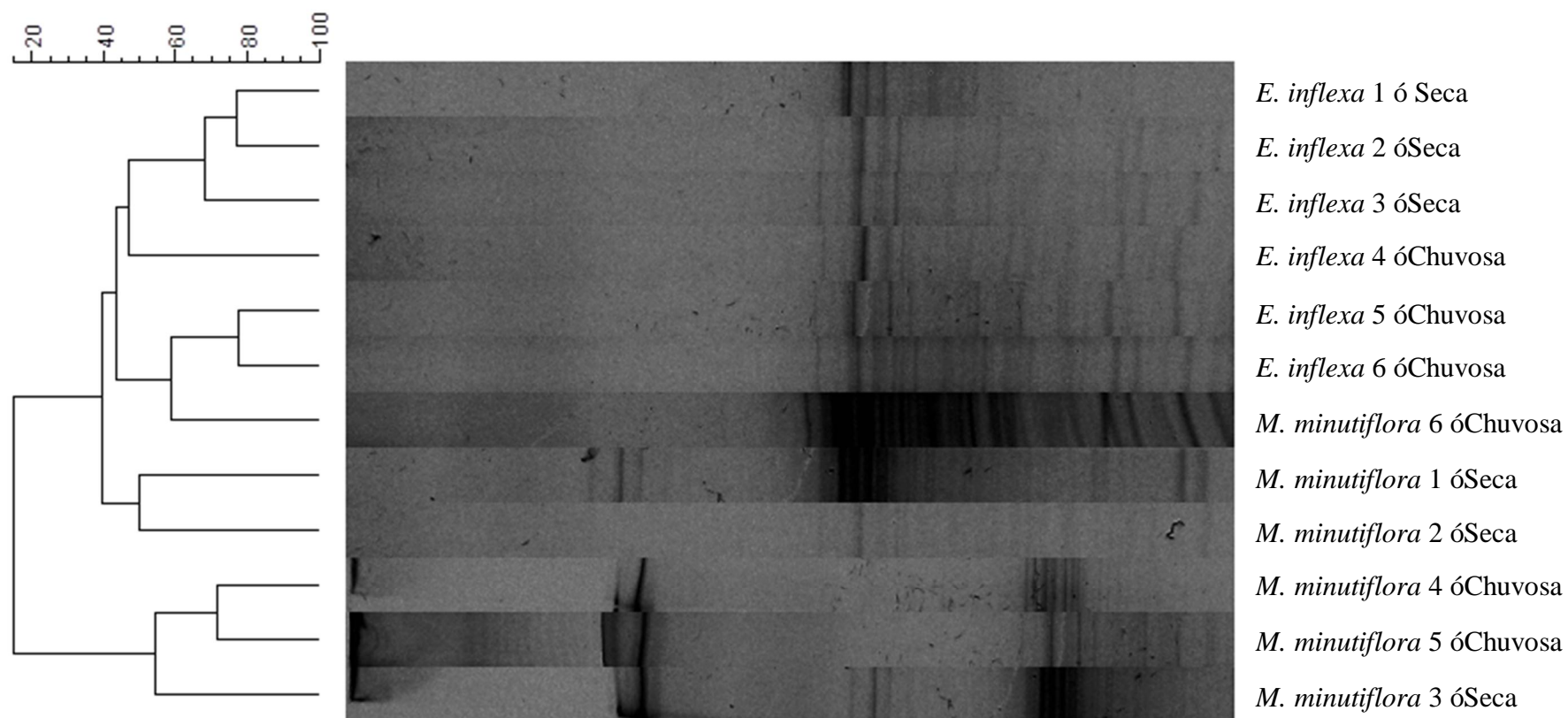


Figura 20. Dendrograma baseado nos perfis das comunidades bacterianas do solo rizosférico de *E. inflexa* e *M. minutiflora*, nas estações seca (agosto 2009) e chuvosa (dezembro 2009). O dendrograma foi construído utilizando-se o algoritmo UPGMA e o coeficiente de similaridade DICE.

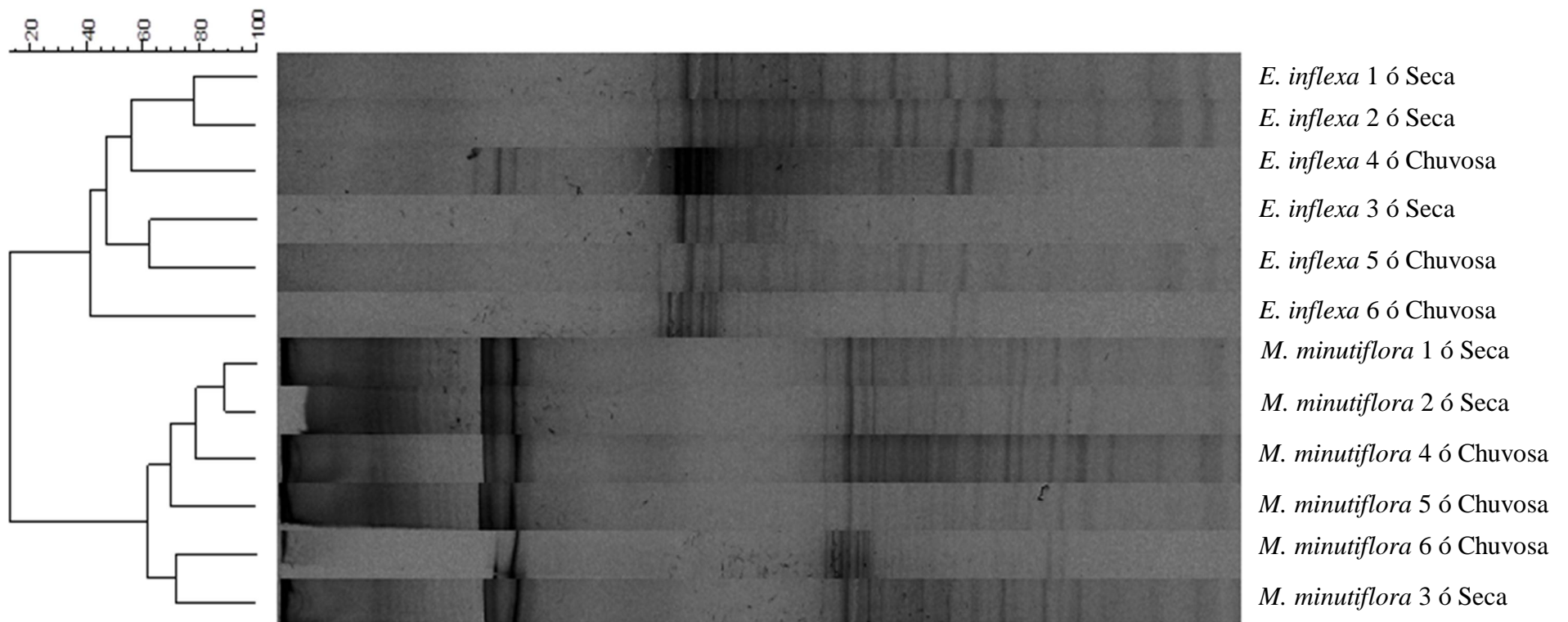


Figura 21. Dendrograma baseado nos perfis das comunidades bacterianas do solo rizosférico de *E. inflexa* e *M. minutiflora*, nas estações seca (agosto 2009) e chuvosa (dezembro 2009). O dendrograma foi construído utilizando-se o algoritmo UPGMA e o coeficiente de similaridade DICE.



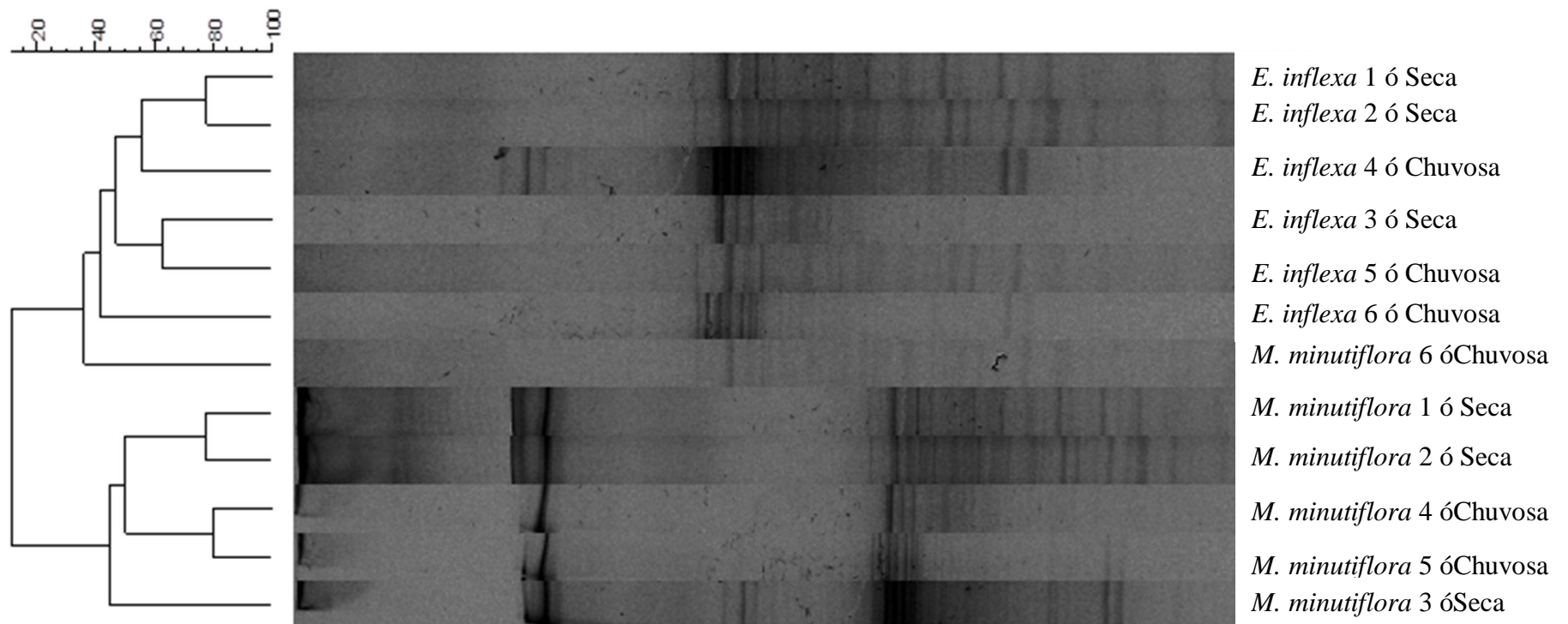


Figura 22. Dendrograma baseado nos perfis das comunidades bacterianas do solo rizosférico de *E. inflexa* e *M. minutiflora*, nas estações seca (agosto 2009) e chuvosa (dezembro 2009). O dendrograma foi construído utilizando-se o algoritmo UPGMA e o coeficiente de similaridade DICE.

## 3.2. Experimento com plantas envasadas em casa de vegetação

### 3.2.1. Características físico-químicas dos solos

O conteúdo gravimétrico das amostras de solo dos vasos de *M. minutiflora*, interação *E. inflexa*+ *M. minutiflora* e vasos sem gramíneas, no tempo inicial (Ti) não apresentou diferenças significativas. Entretanto, os valores encontrados para *E. inflexa*, foram significativamente maiores ( $35,77 \pm 2,16$ ). Para o tempo final (Tf) não houve diferenças entre os vasos (Tabela 2).

No início do experimento, após a mistura de solo com areia (proporção 2:1), os valores de pH foram determinados em H<sub>2</sub>O, apresentando valores entre 4,90 e 5,10. Não houve diferenças para o pH (H<sub>2</sub>O) dos vasos em nenhum dos tempos analisados.

As concentrações de P disponível nos solos foram significativamente maiores para os vasos sem gramíneas ( $4,3 \pm 0,81$  mg/ dm<sup>3</sup>) (Tabela 2), assim como as concentrações de K disponível ( $7,27 \pm 0,40$  mg/ dm<sup>3</sup>). Entretanto, houve diferenças quando comparados os solos dos vasos de *E. inflexa* , *M. minutiflora*, interação *E. inflexa* + *M. minutiflora*, onde os vasos da interação entre as gramíneas apresentaram as maiores concentrações de K disponível ( $2,67 \pm 0,53$  mg/dm<sup>3</sup>).

A concentração de cálcio disponível no solo foi maior nos vasos sem gramíneas, ( $1,85 \pm 0,50$  mg/dm<sup>3</sup>) . Quando comparamos os vasos com gramíneas, as maiores concentrações foram encontradas nos vasos com *E. inflexa* ( $1,16 \pm 0,08$  mg/dm<sup>3</sup>). As concentrações de Mg disponível foram maiores para o solo dos vasos sem gramíneas ( $0,61 \pm 0,14$  cmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup>), assim como os valores de capacidade de troca catiônica (CTC) (Tabela 2). Os valores dos teores de matéria orgânica não apresentaram diferenças significativas entre os vasos.

Tabela 2: Análise das propriedades físico-químicas dos solos dos vasos com *E. inflexa*, *M. minutiflora*, *E.inflexa+M.minutiflora* e solo.

	<i>E. inflexa</i>	<i>M. minutiflora</i>	<i>E.inflexa+M.minutiflora</i>	Solo
P (mg/dm <sup>3</sup> )	1,4±0,36b	1,23±0,25b	1,37±0,15b	4,03±0,81a
K (mg/dm <sup>3</sup> )	0,67±0,58c	0,67±0,58c	2,67±0,53b	7,27±0,40a
Ca <sup>2+</sup> (mg/dm <sup>3</sup> )	1,16±0,08b	0,97±0,22c	0,91±0,16c	1,85±0,50a
Mg <sup>2+</sup> (cmol/dm <sup>3</sup> )	0,19±0,04b	0,19±0,04b	0,18±0,02b	0,61±0,14a
CTC (cmol/dm <sup>3</sup> )	1,35±0,08b	1,16±0,26c	1,09±0,18c	2,64±0,64a
MO (g/kg)	12,57±1,50a	10,83±0,75a	11,70±1,30a	10,83±0,75a
pH (H <sub>2</sub> O) (Ti)	6,07±0,23a	5,77±0,37a	5,65±0,17a	5,59±0,54a
pH (H <sub>2</sub> O) (Tf)	6,09±0,20a	5,87±0,22a	5,89±0,01a	5,41±0,15a
Teor gravimétrico (Ti)	35,77±2,16a	25,12±3,79b	24,25±1,44b	24,07±5,98b
Teor gravimétrico (Tf)	24,57±4,10a	21,0±4,1a	26,62±2,68a	23,55±6,60a

Diferenças significativas entre os tratamentos são representadas por letras minúsculas (p<0,05).

### 3.2.2. Análise da comunidade bacteriana do solo

O DNA de solo obtido através das extrações apresentou pureza e a quantidade suficientes para a realização de PCR, quando visualizado em gel de agarose a 0,8%. Após a realização da PCR, os produtos foram visualizados em gel de agarose a 1% para posterior aplicação nos géis de DGGE. Não foi possível amplificar duas amostras: uma representando a interação entre *E. inflexa* + *M. minutiflora* (Ti) e uma representando a interação *E. inflexa* + *M. minutiflora* (Tf). Para estas amostras possuo somente duas repetições.

As amostras de *E. inflexa*, *M. minutiflora* e interação *E. inflexa* + *M. minutiflora* referentes ao tempo inicial (Ti) separaram-se em quatro grupos com 40% de similaridade. Um primeiro grupo foi formado com as amostras *E. inflexa* (Ti) com 70% de similaridade. A terceira amostra de *E. inflexa* (Ti) se agrupou com uma amostra *M. minutiflora* (Ti) com 80% de similaridade. As duas outras réplicas de *M. minutiflora* (Ti) se agruparam com 40% de similaridade. As amostras da interação *E. inflexa* + *M. minutiflora* (Ti) formaram um grupo separado das demais amostras com 40% de similaridade (Figura 23)

Observou-se no gel referente ao tempo final (Tf) (Figura 24) com as amostras de *E. inflexa*, *M. minutiflora* e interação *E. inflexa* + *M. minutiflora* (Tf) uma separação em dois grandes grupos com 50% de similaridade. Um primeiro grupo foi formado com as amostras *E. inflexa* (Tf) e interação *E. inflexa* + *M. minutiflora* com 65% de similaridade. As duas primeiras amostras de *E. inflexa* (Tf) se agruparam com 90% de similaridade e a terceira, com 80%. As amostras de *M. minutiflora* (Tf) se agruparam com 85% de similaridade e duas réplicas com 100%. As amostras da interação *E. inflexa* + *M. minutiflora* (Tf) se agruparam com similaridade de 60%.

A Figura 25 representa o gel referente às amostras dos vasos sem gramíneas, tanto no tempo inicial (Ti) quanto no tempo final (Tf). As amostras separaram-se formando dois grupos com 50% de similaridade. Houve uma separação entre os tempos Ti e Tf, cada um formado por duas réplicas.

As amostras de *E. inflexa* dos tempos Ti e Tf separaram-se em dois grupos com 40% de similaridade. As amostras referentes ao tempo Ti formaram um grupo com similaridade de 70%, com duas réplicas a 90%. As amostras referentes ao tempo Tf formaram um grupo a 60%, com duas réplicas a 70% de similaridade (Figura 26).

As amostras referentes à interação *E. inflexa* + *M. minutiflora* nos tempos Ti e Tf estão apresentadas na figura 27. As amostras separaram-se em dois grupos com similaridade inferior a 40%. As réplicas do tempo Ti agruparam-se com 60% de similaridade, enquanto as réplicas do tempo Tf, com similaridade inferior a 40%.

As amostras de *M. minutiflora* nos tempo Ti e Tf estão apresentadas na figura 28. Para o tempo Ti só temos duas réplicas, pois a terceira não apresentou perfil de bandas no gel. As amostras separaram-se em dois grupos com similaridade inferior a 40%, onde as amostras referentes ao tempo Ti agruparam-se com similaridade em 50%. As amostras referentes ao tempo Tf apresentaram similaridade acima de 60% e uma delas formou um grupo separado, com similaridade inferior a 40%.

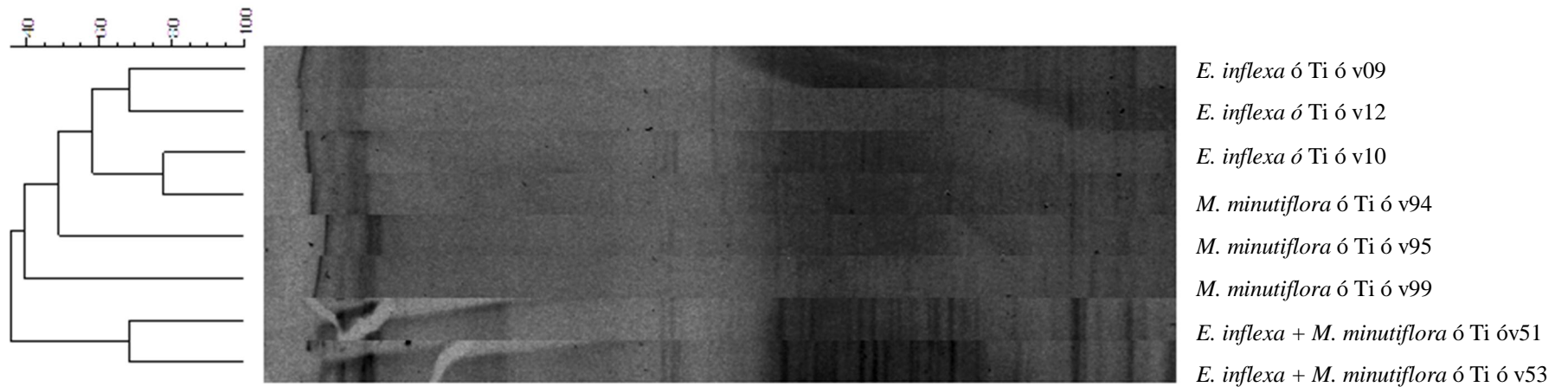


Figura 23. Dendrograma baseado nos perfis das comunidades bacterianas do solo rizosférico de *E. inflexa*, *M. minutiflora* e interação *E. inflexa* + *M. Minutiflora* no tempo inicial (Ti), do experimento com plantas envasadas em casa de vegetação. O dendrograma foi construído utilizando-se o algoritmo UPGMA e o coeficiente de similaridade DICE.

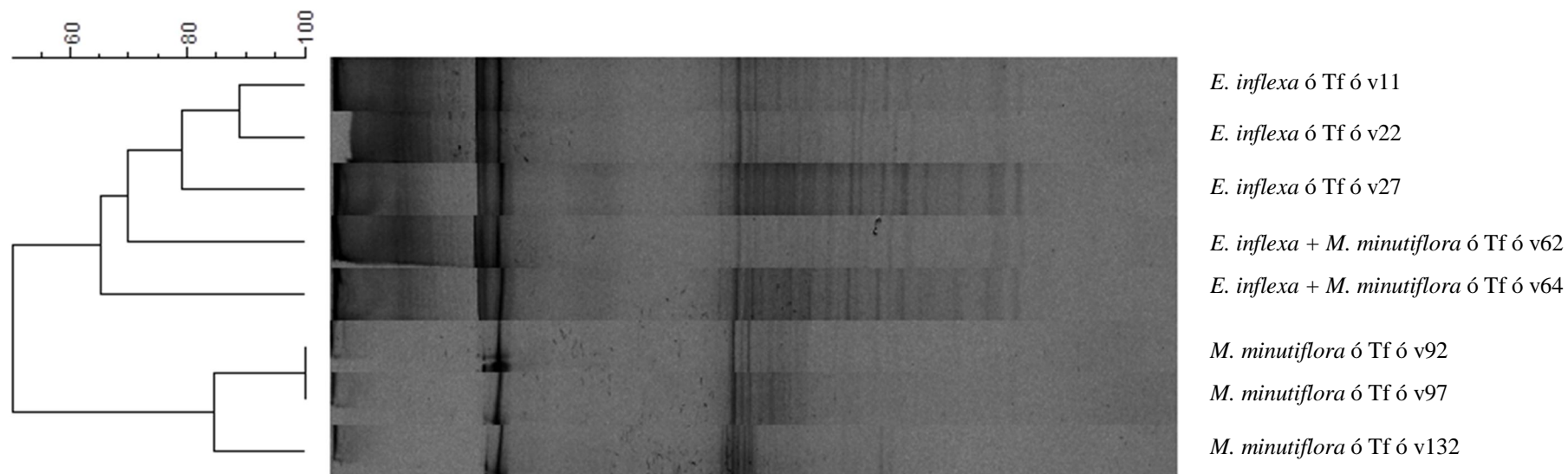


Figura 24. Dendrograma baseado nos perfis das comunidades bacterianas do solo rizosférico de *E. inflexa* , *M. minutiflora* e interação *E. inflexa* + *M. Minutiflora* no tempo final (Tf) , do experimento com plantas envasadas em casa de vegetação. O dendrograma foi construído utilizando-se o algoritmo UPGMA e o coeficiente de similaridade DICE.

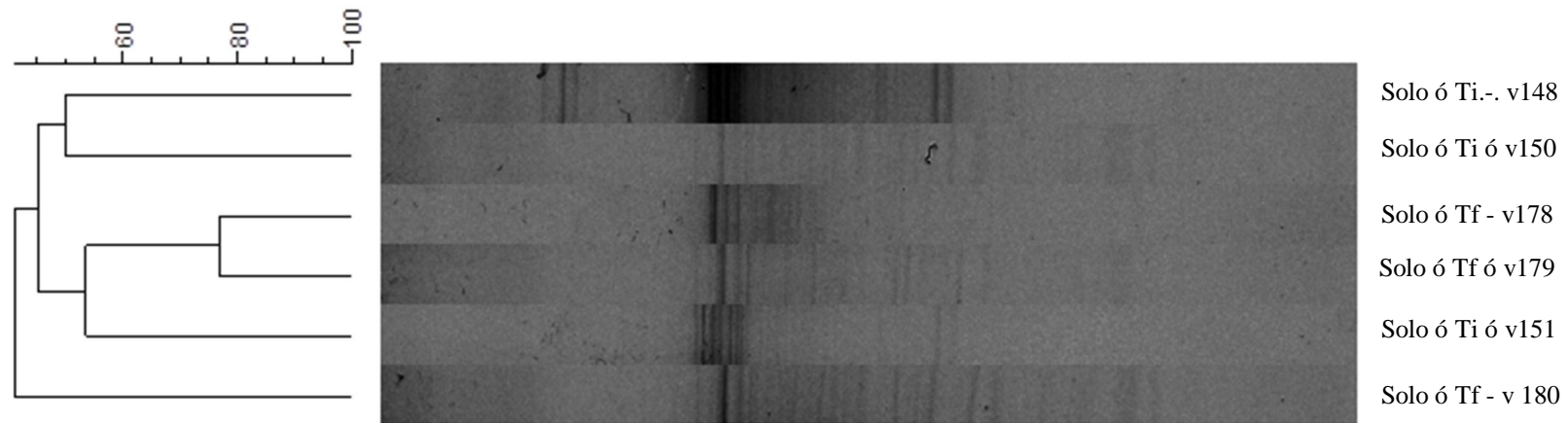


Figura 25. Dendrograma baseado nos perfis das comunidades bacterianas do solo dos vasos sem gramíneas nos tempos inicial e final (Ti e Tf), do experimento com plantas envasadas em casa de vegetação. O dendrograma foi construído utilizando-se o algoritmo UPGMA e o coeficiente de similaridade DICE.



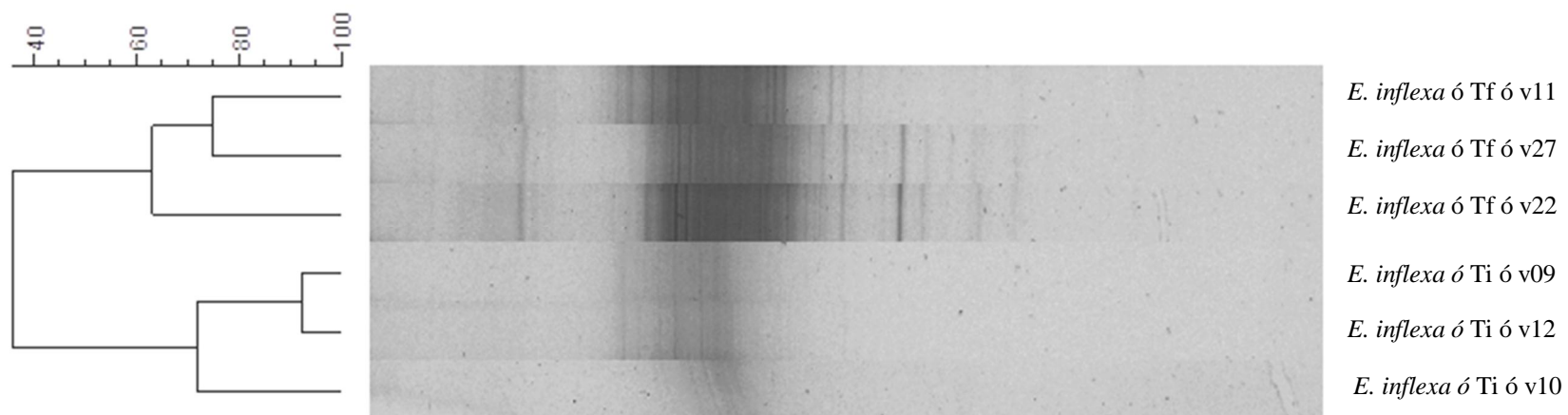


Figura 26. Dendrograma baseado nos perfis das comunidades bacterianas do solo rizosférico de *E. inflexa* nos tempos inicial e final (Ti e Tf), do experimento com plantas envasadas em casa de vegetação. O dendrograma foi construído utilizando-se o algoritmo UPGMA e o coeficiente de similaridade DICE.



Figura 27. Dendrograma baseado nos perfis das comunidades bacterianas do solo rizosférico da interação *E. inflexa* + *M. minutiflora* nos tempos inicial e final (Ti e Tf), do experimento com plantas envasadas em casa de vegetação. O dendrograma foi construído utilizando-se o algoritmo UPGMA e o coeficiente de similaridade DICE.

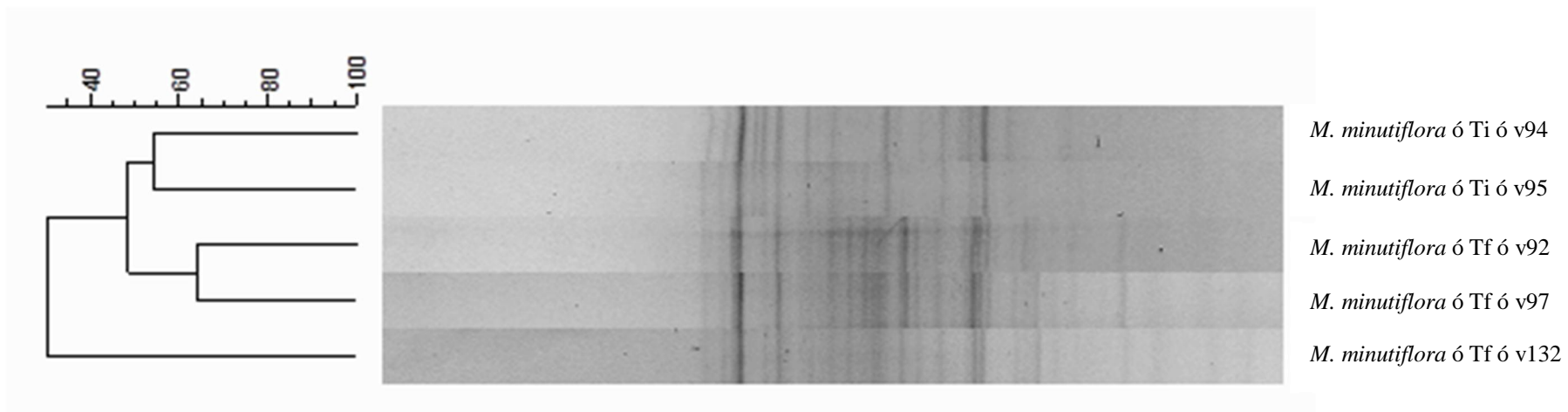


Figura 28. Dendrograma baseado nos perfis das comunidades bacterianas do solo rizosférico de *M. minutiflora* nos tempos inicial e final (Ti e Tf), do experimento com plantas envasadas em casa de vegetação. O dendrograma foi construído utilizando-se o algoritmo UPGMA e o coeficiente de similaridade DICE.

### 3.2.3. Variações na arquitetura e biomassa de raízes

Considerando os vasos em monocultura, para os dados de comprimento total de raízes (CTR), comprimento de raízes finas (CRF), projeção de área total (PAT), superfície total das raízes (ST) e comprimento de parte aérea os valores encontrados foram significativamente maiores em *M. minutiflora* do que em *E. inflexa* (Figuras 29 A, B, C e 30 A e B). No entanto, a biomassa de raízes foi maior para *E. inflexa* (Figura 30 C). A relação entre raízes finas/comprimento total de raízes, comprimento total de raízes/biomassa de raízes e comprimento total de raízes/comprimento da parte aérea (RCC), foram maiores em *M. minutiflora* que *E. inflexa* (Figura 31 A, B, C).

Quando avaliamos os vasos em interação, o comprimento total de raízes (CTR), comprimento de raízes finas (CRF), superfície total das raízes (ST), comprimento de parte aérea foram significativamente maiores para *M. minutiflora*. Para projeção de área total (PAT) os valores entre as duas espécies foram iguais. (Figuras 29 A, B, C e 30 A e B). Em interação, os valores de biomassa de raízes foram maiores para *E. inflexa* (Figura 30 C). A relação de raízes finas: comprimento total de raízes, comprimento total de raízes: biomassa de raízes e comprimento total de raízes: comprimento parte aérea (RCC) foram maiores para a espécie invasora, *M. minutiflora* (Figura 31 A, B, C).

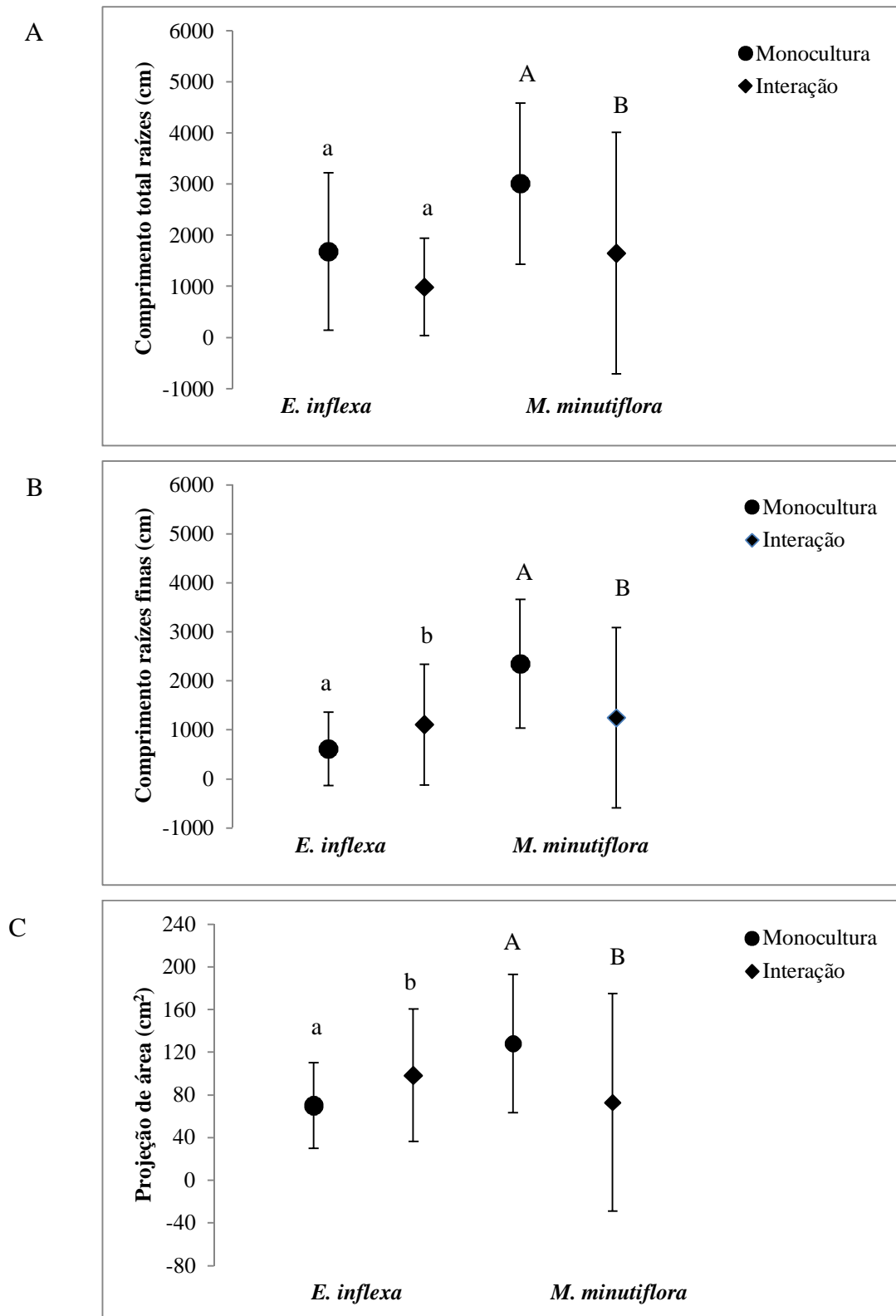


Figura 29: (A) Comprimento total de raízes; (B) Comprimento de raízes finas (CRF); (C) Projeção de área total (PAT) para os vasos de *E. inflexa*, *M. minutiflora* crescidos em monocultura e em interação. Diferenças significativas entre os tratamentos (monocultura e interação) estão indicadas por letras maiúsculas e entre as espécies por letras minúsculas ( $p < 0,05$ ). Médias seguidas por mesma letra minúscula não diferem entre si.

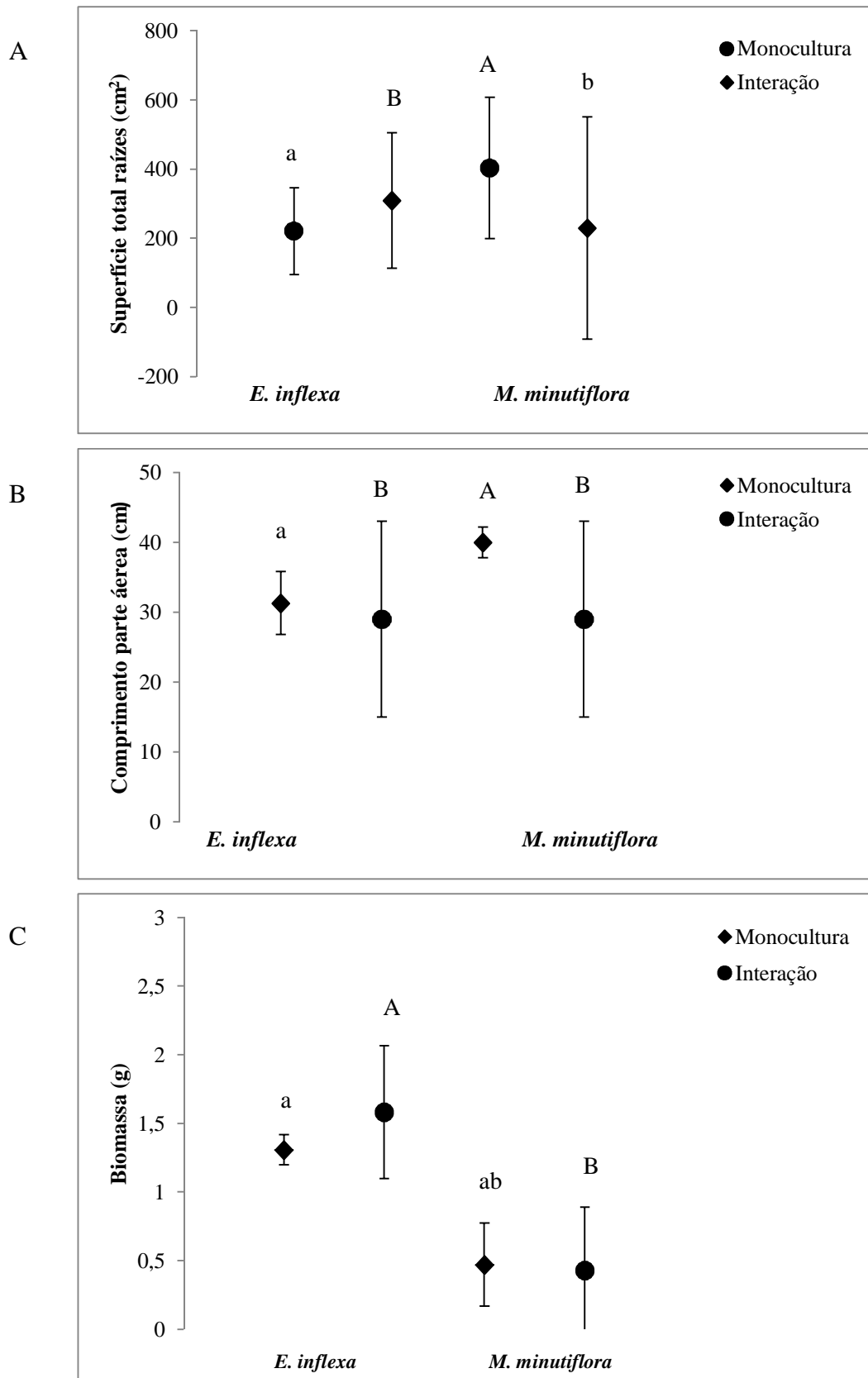


Figura 30. (A) Superfície total de raízes; (B) Comprimento de parte aérea; (C) Biomassa de raízes de *E. inflexa* e *M. minutiflora* crescidos em monocultura e em interação. Diferenças significativas entre os tratamentos (monocultura e interação) estão indicadas por letras maiúsculas e entre as espécies por letras minúsculas ( $p < 0,05$ ). Médias seguidas por mesma letra minúscula não diferem entre si

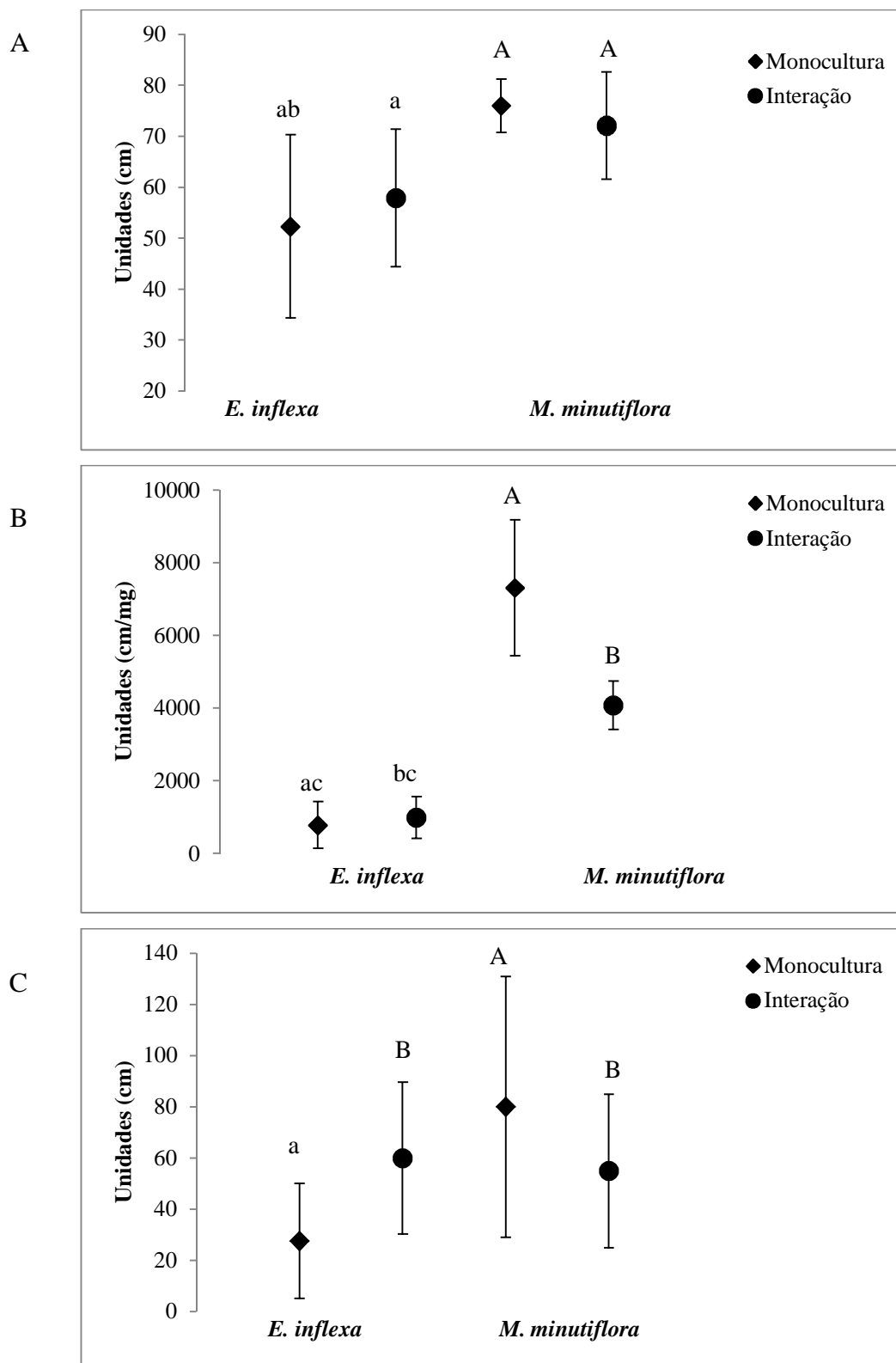


Figura 31. (A) Relação comprimento de raízes finas/ comprimento total de raízes; (B) Relação comprimento total de raízes/biomassa; (C) Relação comprimento total de raízes/comprimento parte aérea. Diferenças significativas entre os tratamentos (monocultura e interação) estão indicadas por letras maiúsculas e entre as espécies por letras minúsculas ( $p < 0,05$ ). Médias seguidas por mesma letra minúscula não diferem entre si.

#### 4. Discussão

As condições encontradas nas rizosferas de *E. inflexa* (espécie nativa) e *M. minutiflora* (espécie invasora) em condições de campo diferiram em todos os parâmetros químicos dos solos analisados, ainda que, as duas espécies tenham sido coletadas nas mesmas condições e nas mesmas áreas. Durante as coletas, observou-se diferenças físicas nos solos da rizosfera de *E. inflexa*, que se soltava mais facilmente das raízes do que o solo aderido às raízes de *M. minutiflora*. A espécie invasora apresentou maiores valores para P, K, Ca disponíveis no solo e também para CTC e matéria orgânica. Para todas as análises realizadas, somente os valores de pH e Al disponível no solo da rizosfera de *E. inflexa* foram significativamente maiores que os de *M. minutiflora*. Segundo Davet (2004) o pH rizosférico difere dos solos adjacentes às plantas. Essas variações são mais ou menos pronunciadas dependendo da capacidade de tamponamento do solo e dos tipos de plantas, onde dicotiledôneas apresentam um efeito maior.

A maior disponibilidade de nutrientes no solo rizosférico de *M. minutiflora* pode ser atribuído a fatores ecofisiológicos como a exploração mais eficiente dos recursos (BARUCH & GÓMEZ, 1996), capacidade de resistir melhor à seca (BARUCH & FERNANDES, 1993). Neste estudo, o solo da rizosfera de *M. minutiflora* apresentou valores maiores de nutrientes no solo. Talvez, a comunidade bacteriana da rizosfera de *M. minutiflora* poderia estar favorecendo a espécie na absorção de nutrientes.

Uma das estratégias utilizadas pelas espécies de plantas invasoras para competir e dominar em comunidades vegetais é a liberação de aleloquímicos, produtos do metabolismo secundário, tendo como matérias-primas as substâncias originadas no metabolismo primário (LACHER, 2000). A alelopatia é o efeito de uma planta sobre outra, através da liberação de substâncias no ambiente que apresentam ação direta ou indireta sobre espécies vizinhas, incluindo-se interações intra e inter plantas e microorganismos, podendo haver domínio de uma espécie sobre outra, que apresenta susceptibilidade no ambiente compartilhado (RICE, 1979). Essas substâncias encontram-se em todas as partes da planta, principalmente nas raízes e folhas (REZENDE, 2003).

A realização do PCR-DGGE usando *primers* baseados na região conservada da sequência do 16S rDNA apresenta perfis complexos quando usados para analisar a microbiota do solo. Os perfis obtidos refletem a composição dominante da microbiota,



formando um padrão entre as amostras analisadas (DUARTE *et al.*, 2001). Outra forma de interpretação dos géis pode ser em relação à intensidade das bandas presentes nos perfis, onde a intensidade estaria diretamente ligada à densidade de bactérias presentes na amostra (FROMIN *et al.*, 2002).

Nas análises do 16S rDNA através de DGGE observou-se diferenciação dos perfis bacterianos, com uma nítida separação entre as comunidades bacterianas da rizosfera das espécies de *E. inflexa* e *M. minutiflora*, bem como entre as comunidades bacterianas nas estações seca-chuvosa.

Podemos observar que o efeito na diferenciação das comunidades bacterianas do solo rizósferico das espécies estudadas permanece nas duas estações, seca e chuvosa, mostrando que os efeitos provocados pelas espécies podem ser prolongados. A variação entre as espécies de plantas e liberação de exsudatos podem ter influenciado o processo de fracionamento das amostras de solo, para extração de DNA, a que foram submetidas essas amostras. A liberação de recursos nutricionais na rizosfera como nitrogênio, carbono e fósforo pelas plantas estimulam o aumento da comunidade de microrganismos e a competição entre eles (ROVIRA, 1976). DeAngelis *et al.* (2009) mostraram uma ampla diversidade bacteriana ainda não descrita em solos rizosféricos de aveia, sugerindo que esta diversidade é estimulada pela atividade das raízes.

Quando as coletas foram realizadas, foi possível observar a coexistência das duas espécies de gramíneas. Situação semelhante encontraram Pivello *et al.* (1999) em levantamento realizado na Reserva Biológica do Cerrado de Emas (Pirassununga, SP). Os autores observaram um padrão de distribuição similar entre as espécies de *E. inflexa* e *M. minutiflora*, sendo encontrados em ambas altos índices de biomassa aérea e densidade. A associação positiva verificada através da avaliação dos dados de biomassa aérea e densidade permitiu aos autores inferir que *M. minutiflora* não exclui a espécie nativa. Entre os fatores adaptativos que poderiam permitir a alta frequência e a coexistência dessas espécies estaria a grande capacidade de crescimento vegetativo, resultado da total conversão de fotoassimilados em biomassa alocada para as folhas (KLINK, 1996). Estudos teóricos predizem que as espécies invasoras irão ocupar o mesmo nicho das espécies nativas e que estas irão produzir um novo padrão de organização (SCHEFFER & VAN NES, 2006).

Quando analisamos os mesmos parâmetros físico-químicos referentes aos vasos não foi possível observar a mesmas diferenças entre as espécies. Para todos os tratamentos, os maiores valores de nutrientes estavam nos vasos com solo e não nos

vasos com gramíneas. Somente em interação *E. inflexa* + *M. minutiflora*, o elemento K apresentou maior valor em relação a *E. inflexa* e *M. minutiflora* em monocultura. Para Ca e CTC, *E. inflexa* apresentou maior valor em relação a *M. minutiflora* e interação.

Em relação aos dados de arquitetura de raízes e biomassa, a espécie invasora apresentou os maiores valores para todos os parâmetros analisados quando em monocultura e em interação. Entretanto, somente para os valores de biomassa de raízes os valores foram maiores para *E. inflexa*, tanto em monocultura quanto em interação.

As plantas podem competir entre si (intraespecífica) e com outras plantas (interespecíficas) pelos recursos do meio (luz, água, nutrientes, CO<sub>2</sub>). A duração do tempo da competição determinará prejuízos no crescimento, no desenvolvimento e, conseqüentemente, na produção, em caso de culturas. Uma redução considerável no crescimento de espécies, tanto em combinações intra como interespecíficas, é resultante da competição espacial entre grupos de plantas que ocupam o mesmo local em um determinado período de tempo (SCHOENER, 1983). Raventós & Silva (1995) argumentaram que essa redução ocasionada por plantas vizinhas, poderia ser devido à competição por água durante a estação seca e por luz durante a estação úmida, sendo que a natureza complexa da competição entre plantas tem sido amplamente ignorada, sendo investigada apenas na forma de estudos experimentais e em condições controladas. No entanto, a competição interespecífica por ambientes favoráveis ao estabelecimento das plantas ao longo do tempo evolutivo, pode estar gerando adaptações nas estratégias de regeneração das espécies.

A projeção de área de raízes foi igual para as duas espécies quando em interação. As duas espécies ocuparam o maior espaço possível dentro dos vasos para poder obter maiores recursos de nutrientes e água. A competição entre as espécies pode alterar os mecanismos de utilização e aquisição de nutrientes pelas plantas maximizando a captação dos recursos escassos (SILVA & DELATORRE, 2009).

O sistema radicular das plantas é muito importante para a exploração do solo e absorção de água e nutrientes. A habilidade para ocupar o subterrâneo do solo depende de diversas características das raízes, incluindo taxa de crescimento relativo, densidade de raiz fina, biomassa e área superficial total da raiz (HODGE, 2009). No presente estudo, a competição entre as espécies afetou mais a espécie nativa do que a invasora.

O maior valor de biomassa encontrado para as raízes de *E. inflexa* pode estar relacionado ao fato de que plantas de cerrado apresentem sistema radicular bem desenvolvido para sobreviver nos períodos de seca e quando ocorrem queimadas

(DELITTI *et al.*, 2001). Variações na biomassa de raízes podem ser devido a translocações de carboidratos e nutrientes entre brotos e raízes. Estas transferências permitem que as comunidades de plantas se adaptem às condições de mudança em ambientes de savana (VOGT *et al.*, 1998). Em competição, *E. inflexa* pode ter alocado seus recursos em biomassa de raízes.

A relação comprimento total de raízes/comprimento de parte aérea pode ajudar a explicar como os fatores afetam e modificam o crescimento da planta. As plantas têm capacidade para compensar deficiências, como limitação de nutrientes, aumentando o tamanho da raiz em relação à demanda da parte aérea, aumentando a densidade e o comprimento de raízes finas (BARBER, 1979). Uma menor relação raízes/parte aérea pode significar um sistema radical mais extenso e, possivelmente, mais eficiente (BUTTERY & BIZZELL, 1972). Entretanto, isto não foi observado em nenhuma das espécies estudadas. *M. minutiflora* apresentou valores maiores para comprimento total de raízes e relação raízes/parte aérea. As espécies invasoras são dotadas de uma arquitetura foliar mais eficiente na captação da luz solar e transformação em energia, essencial para o desenvolvimento da planta (VITÓRIA FILHO, 1985).

Similar ao observado em condições de campo, os perfis das bandas dos géis de DGGE permitiram a observação da nítida separação entre os vasos com *E. inflexa*, *M. minutiflora* e da interação entre as gramíneas no tempo inicial (Ti). Os perfis mais contrastantes de bandas foram os pertencentes à *M. minutiflora*. Quando analisamos o tempo final (Tf) verificamos o mesmo padrão de agrupamento, com uma diferenciação entre as espécies de gramíneas e a interação.

Vários estudos tem sido realizados com o objetivo de verificar o efeito de nutrientes nas rizosferas (GOMES *et al.*, 2001; MOTA *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2003), utilizando-se a técnica de PCR-DGGE, entretanto não foram encontrados trabalhos com objetivos de verificar diferenças na comunidade bacteriana de rizosferas em experimento com interação entre gramíneas.

Como o PCR-DGGE da região 16S rDNA avalia a comunidade bacteriana predominante existente na rizosfera, metabolicamente ativa ou não (PROSSER, 2002), mudanças no perfil metabólico de cada espécie podem ser responsáveis pelas diferenças constatadas entre as espécies de gramíneas e entre as interações. Quando as duas espécies de gramíneas estavam em interação, o perfil dos géis apresentou um número maior de bandas, ao contrário das espécies em monocultura. As atividades dos microrganismos estão baseadas em sua notável diversidade metabólica e adaptabilidade

genética (KURTBORKE *et al.*, 2004), e aparentemente a interação entre as gramíneas produziu uma comunidade bacteriana diferenciada. A rizosfera cria um ambiente favorável e protegido para microrganismos (ANDRADE *et al.*, 1998). A magnitude dessas alterações nas propriedades do solo é largamente determinada pela quantidade e tipo de C liberado da raiz, bem como de características intrínsecas do solo. As raízes metabolicamente ativas secretam várias formas de materiais orgânicos. Entre 40 e 95% do carbono transferido para as raízes é perdido como rizodeposição no solo, constituindo-se em considerável fluxo de carbono que influencia a modulação da estrutura de comunidades microbianas presentes nesses habitats (MARRIEL *et al.*, 2005).

A quantidade e a qualidade dos exsudatos liberados pela raiz também alteram a química do solo e influenciam a comunidade bacteriana que coloniza a rizosfera e utiliza esses exsudatos como fonte de carbono (BAUDOIN *et al.*, 2001). A composição desses exsudatos pode variar com a idade e o genótipo da planta, o metabolismo, a condição nutricional, o tipo de estresse e outros fatores ambientais (RICHARDSON *et al.*, 2009).

DeAngelis *et al.* (2009) mostraram uma ampla diversidade bacteriana ainda não descrita em solos rizosféricos de aveia, chamando atenção que muito ainda necessita ser estudado para que possamos entender como este sistema funciona.

Podemos observar que a interação entre as duas espécies provoca alterações tanto na comunidade microbiana do solo quanto no desenvolvimento das espécies. Calvaruso *et al.* (2003) em trabalho realizado com amostras de solos de floresta observaram que as comunidades bacterianas da rizosfera podem alterar o crescimento das plantas por modificarem a disponibilidade de nutrientes do solo. Variações no pH do solo, aeração e características físico-químicas resultam em condições distintas para o solo, impactando diretamente a comunidade microbiana da rizosfera (MARSCHNER *et al.*, 2001).

O solo da rizosfera apresenta características químicas e microbiológicas distintas do solo total. Exsudatos de raízes são fontes de carbono e energia para a comunidade microbiana do solo. Alguns trabalhos mostram as diferenças encontradas para solos rizosféricos de plantação de milho e para solos de florestas temperadas. Os solos distantes das plantas apresentam diversidade microbiana diferente. As plantas alteram a química do solo através da liberação de exsudatos pelas raízes finas e através da interação mutualista entre os fungos que habitam a região das raízes (ACOSTA-

MARTINEZ *et al.*, 2008; BERG *et al.*, 2009; OH *et al.*, 2012). Este pode ser um dos motivos pelos quais os solos dos vasos sem gramíneas apresentaram perfis bacterianos diferentes das amostras de solo com as gramíneas *E. inflexa* e *M. minutiflora*.

## 5. Conclusões

Diante da hipótese formulada de que as espécies de gramíneas invasoras afetam a diversidade da comunidade bacteriana do solo em áreas nativas de cerrado em função de diferenças no investimento em biomassa radicular e no padrão de absorção e uso de nutrientes foi possível concluir através dos experimentos em campo e em casa de vegetação que:

### **Experimento em campo**

A maioria dos parâmetros químicos do solo diferiu no solo rizosférico da espécie invasora, *Melinis minutiflora*, em comparação com a espécie nativa, *Echinolaena inflexa*, independentemente da estação do ano.

A maior disponibilidade de nutrientes encontrada na rizosfera de *Melinis minutiflora* pode ser um fator da diferenciação observada para as comunidades bacterianas associadas à rizosfera das duas espécies de gramíneas detectadas através da técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) obtidas para as sequências de 16S rDNA. Nos géis analisados a espécie nativa, *Echinolaena inflexa*, apresentou um maior número de bandas quando comparados a espécie invasora *Melinis minutiflora*.

### **Experimento em casa de vegetação**

Como observado em situação de campo, também nos vasos a espécie invasora alterou a maioria dos parâmetros químicos do solo, havendo diferenciação da comunidade bacteriana entre as espécies nos tratamentos em monocultura e em interação entre elas. Adicionalmente, a espécie invasora apresentou maior crescimento tanto em monocultura quanto em interação em relação à espécie nativa podendo assim ter explorado melhor os recursos do solo.

O período de desenvolvimento das espécies também foi fator de diferenciação das comunidades bacterianas. O estabelecimento das espécies alterou a diversidade bacteriana do solo quando comparados ao controle (vasos sem gramíneas). O aumento do número de bandas e com maior intensidade são observadas nos géis quando as espécies já estão estabelecidas. Este resultado esteve presente nas duas espécies

estudadas, *Echinolaena inflexa* e *Melinis minutiflora*, bem como, na interação entre elas. A diferenciação ocorreu no número de bandas apresentados nos géis, onde um número maior de bandas foi encontrado para a espécie nativa, *Echinolaena inflexa*.

## 6. Referências Bibliográficas

- BARBER, S.A. 1979. Growth requirements for nutrients in relation to demand at the root surface. In: Harley, J. L. e Russel, S. The soil-root surface. *Proceedings of an international symposium*, Oxford. Proceedings. London: Academic Press, p. 5-20.
- BARDGETT, R.D.; SHINE, A. 1999. Linkages between plant litter diversity, soil microbial biomass and ecosystem function in temperate grasslands. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 317-321.
- BARUCH, Z., FERNÁNDEZ, D.S. 1993 Water relations of native and introduced C4 grasses in a neotropical savanna. *Oecologia* 96:179-185.
- BARUCH, Z., GÓMEZ, J. 1996. Dynamics of energy and nutrient concentration and construction cost in a native and two alien C4 grasses from two neotropical savannas. *Plant and Soil* 181: 175-184
- BAUDOIN, E., BENIZRI, E.; GUCKERT, A. 2001. Metabolic fingerprint of microbial communities from distinct maize rhizosphere compartments. *European Journal of Soil Biology* 37 [2]: 85-93.
- BERG, G., SMALLA, K. 2009. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS, Microbiology Ecology* 68 [1]:1-13.
- BITTENCOURT, M.D.; MESQUITA Jr., H.N. 2005. Análise Ambiental Espacializada da gleba Pé-do-Gigante. In: Pivello, V.R.; Varanda, E.M. (org). O Cerrado Pé-do-Gigante - Parque Estadual do Vassununga - Ecologia e Conservação. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente.
- BOWATTE, S., BARRETT, B., LUSCOMBE, C., HUME, D. E., LUO, D., THEOBALD, P., NEWTOWN, P.C.D. 2011. Effect of grass species and fungal endophyte on soil nitrification potencial. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 54 [4]: 275-284.
- CALLAWAY, R.M., ASCHEHOUG, E.T. 2000. Invasive plants versus their new and old neighbors: a mechanism for exotic invasion. *Science* 290 [5491]: 521-523.
- CALVARUSO, C, TURPAULT, M.P, FREY-KLETT, P. 2006. Root-associated bacteria contribute to mineral weathering and to mineral nutrition in trees: a budgeting analysis. *Applied Environmental Microbiology* 72: 1258-1266.
- CLEVELAND, C.C.; TOWNSEND, A.R.; SCHMIDT, S.K. 2002. Phosphorus limitation of microbial process in moist tropical forests: evidence from short-term laboratory incubations and field studies. *Ecosystems* 5: 680-691.
- COUTINHO, L.M. 2006. O conceito de bioma. *Acta Botanica Brasilica* 20:13-23.
- DA MOTA, F.F., NÓBREGA, A., MARRIEL, I.E, PAIVA, E., SELDIN, L. (2002) Diversity of *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from the rhizosphere of four maize genotypes plants in Cerrado soil. *Applied Soil Ecology* 20:1196132.
- DAVET, P. 2004. Effect of environment on microorganisms p. 83-110. In: *Microbial Ecology of the Soil and Plant Growth*. Science Publishers, INC.
- DEANGELIS, K.M., BRODIE, E.L., DESANTIS, T., ANDERSEN, G., LINDOW, S., FIRESTONE, M.K. 2009. Selective progressive response of soil microbial community to wild oat roots. *ISME Journal* 3 [2]: 1686178.
- DELITTI, W.B., PAUSAS, J.G., BURGER, D.M. 2001. Belowground biomass seasonal variation in two Neotropical savannas (Brazilian Cerrados) with different fire histories. *Annals of Forest Science* 58:7136721.



- DUARTE, G.F.; ROSADO, A.S.; SELDIN, L.; ARAUJO, W.; VAN ELSAS, J.D. 2001. Analysis of bacterial community structure in sulfurous-oil-containing soils and detection of species carrying Dibenzothiophene Desulfurization (*dsz*) genes. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (3): 1052-1062.
- EITEN, G. 1972. The cerrado vegetation of Brazil. *Botanical Review* 38: 201-341.
- EPPINGA, M.B; RIETKERK, M.; DEKKER, S.C.; DE RUITER, P.C.; VAN DER PUTTEN, W.H. 2006. Accumulation of local pathogens: a new hypothesis to explain exotic plant invasions. *Oikos* 114:1686-176.
- FILGUEIRAS, T.S. 1990. Africanas no Brasil: Gramíneas introduzidas da África. *Cadernos de Geociências* 5: 57-63.
- FREITAS, G.K. 1999. Invasão biológica do capim-gordura (*Melinis minutiflora* Beauv) em um fragmento de cerrado (A.R.I.E Cerrado Pé-de-Gigante, Santa Rita do Passa Quatro). Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo.
- FROMIN, N.; HAMELIN, J.; TARNAWSKI, S.; ROESTI, D.; JOURDAIN-MISEREZ, K.; FORESTIER, N.; TEYSSIER-CUVELLE, S.; GILLET, F.; ARAGNO, M.; ROSSI, P. 2002. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology* 4 [11]: 634-643.
- GOMES, R.C.; SÊMEDO, L.T.A.S; SOARES, R.M.A; LINHARES, L.F; ULHOA, C.J.; ALVIANO, C.S. 2001. Purification of a thermostable endochitinase from *Streptomyces* RC1071 isolated from a cerrado soil and its antagonism against phytopathogenic fungi. *Journal of Applied Microbiology* 90: 653-661.
- HARIDASAN, M. 1994. Solos do Distrito Federal. p. 321-344. In: Novaes-Pinto M. (ed.) *Cerrado: Caracterização, ocupação e perspectivas ó O caso do Distrito Federal*. 2ed. Editora da Universidade de Brasília/SEMATEC, Brasília. 681p.
- HODGE, A. 2009. Root decisions. *Plant, Cell and Environment* 32:628-640.
- KLINK, C.A. 1996. Relação entre o desenvolvimento agrícola e a biodiversidade. In: Pereira, R.C., Nasser, L.C.B. (Eds.), *First International Symposium on Tropical Savannas (Proceedings)*. Brasília, pp 25-27.
- KURTBÖKE, D.I.; SWINGS, J.; STORMS, V. 2004. Microbial genetic resources and Biodiscovery. In Ipek Kurtböke & Jean Swings (eds.), *Microbial Genetic Resources and Biodiscovery* WFCC Publications, UK.
- LAIRD, N.M.; WARE, J.H. 1982. Random-Effects Models for Longitudinal Data. *Biometrics* 38 [4]: 963-974.
- LARCHER, W. 2000. *Ecofisiologia vegetal*. São Carlos: RiMa. 531p.
- MACK, M.C.; DØ ANTONIO, C.M. 2003. Exotic grasses alter controls over soil nitrogen dynamics in Hawaiian woodland. *Ecological Applications* 13[1]: 154-166.
- MARRIEL, I.E.; OLIVEIRA, C.A.; RAPOSEIRAS, R.; GOMES, E.A.; LANNA, U.G.P.; CARNEIRO, A.A.; CARNEIRO, N.P. 2005. Aplicação da Técnica Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE) na caracterização de microrganismos dominantes na rizosfera de plantas cultivadas em solo ácido. Sete Lagoas, Embrapa-CNPMS. 8p. (Circular Técnica, 72)
- SCHWFFER, M., VAN NES, E H. 2006. Self-organized similarity, the evolutionary emergence of groups of similar species. *PNAS* 18[103]: 6230-6235.
- MOROSINI, I.B.; KLINK, C.A. 1997. Interferência do capim-gordura (*Melinis minutiflora* Beauv) no desenvolvimento de plântulas de embaúba (*Cecropia pachystachya* Trécul). In: Leite, L.L.; Saito, C.H. (eds) *Contribuição ao conhecimento ecológico do Cerrado*. Brasília: Universidade de Brasília, Departamento de Ecologia, p. 82-86.

- MUYZER, G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 2: 317-322.
- PIVELLO, V.R.; CARVALHO, V.M.C.; LOPES, P.F.; PECCININI, A.A.; ROSO, S. 1999 a. Abundance and distribution of native and alien grasses in a *õcerradoõ* (Brazilian savanna) biological reserve. *Biotropica* 31 [1]: 71-82.
- PIVELLO, V.R.; SHIDA, C.N.; MEIRELLES, S.T. 1999b. Alien grasses in Brazilian savannas: a treat to the biodiversity. *Biodiversity and Conservation* 8[9]: 1281-1294.
- PROSSER, J.I. 2002. Molecular and functional diversity in soil micro-organisms. *Plant and Soil* 244:9-17.
- REZENDE, A.V.; TEIXEIRA DO VALE, A.; SANQUETTA, C.A.; FIGUEIREDO FILHO, A.; FELFILI, J.M. 2006. Comparação de modelos matemáticos para estimativa do volume, biomassa e estoque de carbono da vegetação lenhosa de um cerrado *sensu stricto* em Brasília, DF. *Scientia Florestalis* 71: 65-76.
- RICE, E.L. 1968. Inhibition of nodulation of inoculated legumes by pioneer plant species from abandoned fields. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 95: 346-358.
- RICHARDSON, A.E.; BAREA, J.-M.; MCNEILLI, A.M.; PRINGENT-COMBARET, C. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil* 321: 305-339.
- ROVIRA, A. D. 1976. Plant root exsudates. *The Botanical Review* 35[1]: 35-57.
- SILVA, F. A. M.; NOGUERIA, F.D.; RIBEIRO, L.L.; GODINHO, A.; GUIMARÃES, P.T.G. 2001. Exsudação de ácidos orgânicos em rizosfera de plantas daninhas. *Planta Daninha* 19 [2]: 193-196.
- SILVA, A.A., DELATORRE, C.A. 2009. Alterações na arquitetura de raiz em resposta à disponibilidade de fósforo e nitrogênio. *Revista de Ciências Agroveterinárias* 8 [2]: 152-163.
- VANCE, E.D.; NADKARNI, N.M. 1990. Microbial biomass and activity in canopy organic matter and the forest floor of a tropical cloud forest. *Soil Biology and Biochemistry* 22[5]:677-684.
- VITÓRIA FILHO, R. 1985. Fatores que influenciam a absorção foliar dos herbicidas. *Informe Agropecuário* 11[129]: 31-38.
- WARDLE, D.A.; NICHOLSON, K.S. 1996. Synergistic effects of grassland plant species on soil microbial biomass and activity: implications for ecosystem-level effects of enriched plant diversity. *Functional Ecology* 10: 410-416.

## **CAPÍTULO 3**

### **EFEITOS DO PLANTIO DE ARBÓREAS EM UMA PASTAGEM SOBRE A COMUNIDADE BACTERIANA DO SOLO**

#### **RESUMO**

O bioma Cerrado é o segundo maior bioma no Brasil e consiste em um mosaico de vegetação com diferentes fitofisionomias, variando entre campos abertos até florestas densas e florestas secas. Um recente e intenso processo de ocupação transformou o bioma na mais importante região para pecuária e cultivo no Brasil. A degradação de pastagens é um dos maiores problemas na agricultura, com consequências severas para o ambiente no bioma Cerrado. O objetivo deste trabalho foi comparar a comunidade bacteriana do solo associada a três áreas do bioma Cerrado: uma área nativa de cerrado, uma área de pastagem em uso e uma área de pastagem com plantio de arbóreas. Utilizamos a técnica de pirosequenciamento para caracterizar as comunidades bacterianas em 18 amostras de solo. As amostras representaram as diferentes áreas e estações, chuvosa e seca, a que estão submetidas. Na área de cerrado nativo, os perfis mostraram um padrão diverso de distribuição, sem um grupo dominante. O filo Acidobacteria foi dominante na área de pastagem em uso e na pastagem com plantio de arbóreas, seguido pelos filos Firmicutes, Planctomycetes e Proteobacteria. A sazonalidade das estações foi um fator marcante na diferenciação entre os filos das áreas amostradas.

## **ABSTRACT**

The Cerrado biome, the second largest biome in Brazil, consists of a mosaic of different habitat types, ranging from open grasslands to dense woodlands and dry forests. An intensive recent occupation process has transformed it into the most important region for cattle ranching and intensive plantation commodity crops in Brazil. The degradation of pastures is an important problem, leading to serious environmental consequences in Cerrado biome. Restoring those areas may become strategic, both, for the economical importance of the agrosystems, and for their preservation, since degradation is very associated to erosion, causing sediment deposition in rivers and lakes. The purpose of this work was to compare the bacterial soil communities associated with three areas in Cerrado biome: a native cerrado area, a pasture in use and a pasture planted with tree species. We used a barcoded pyrosequencing technique to characterize bacterial communities in 18 soils samples. In the native cerrado area, the bacterial community profile showed a diverse pattern of distribution, without a dominant group. Acidobacteria were dominant in pasture in use and pasture with tree species, followed by Firmicutes, Planctomycetes and Proteobacteria. Seasonality of the precipitation was an important factor differentiating between the phyla of the sampled areas.

### 3.1. Introdução

O Cerrado é o segundo maior bioma da América Latina com uma área de aproximadamente 204 milhões de hectares (CSR/IBAMA 2009), ocupando cerca de 25% do território brasileiro, localizado principalmente na região central do país. É considerado a savana com maior riqueza de espécies do mundo com mais de 11.000 espécies de plantas, das quais 4.400 são endêmicas (MENDONÇA *et al.*, 2008; MYERS *et al.* 2000).

Apesar de estudos mostrando sua alta biodiversidade, o Cerrado sofre com intenso desmatamento em decorrência da expansão das atividades agropecuárias e crescimento urbano. Considerando o período entre 2002 e 2008, os remanescentes do Cerrado foram reduzidas de 55,7% para 51,5% , segundo o relatório técnico de monitoramento de desmatamento do bioma (MMA/IBAMA/PNUD), onde apenas 7,4% de toda a área natural do bioma é integralmente protegida por unidades de conservação (CSR/IBAMA, 2009).

O uso da terra no bioma, tem se caracterizado pelos sistemas de produção intensiva e mecanizada, com utilização de elevadas doses de fertilizantes e pesticidas.

A conversão da vegetação nativa em pastagens cultivadas representou uma alternativa para aumentar a produção de carne da região. Isso foi obtido pela introdução de espécies forrageiras de origem africana, de grande capacidade de adaptação a solos e climas, dos gêneros *Brachiaria* (corresponde a mais de 80% das pastagens cultivadas do Centro-Oeste brasileiro), *Panicum* e *Andropogon* (BROSSARD & BARCELLOS, 2005).

Além de ser responsável por grande parte da produção de grãos no país, a pecuária do Cerrado representa 40% do rebanho bovino do País, contribuindo com aproximadamente 43% da carne brasileira produzida (BNDES 2009). No Brasil, ocupam cerca de três quartos da área agrícola nacional (BRASIL, 2006), cerca de 210 milhões de hectares, assumindo posição de destaque no cenário agrícola brasileiro.

Apesar de vários estudos mostrando sua alta diversidade, o Cerrado apresenta hoje, aproximadamente, 37% de sua cobertura vegetal perdida principalmente para áreas de pastagens. Pesquisas mostram que 70% das pastagens brasileiras estão em processo de degradação, principalmente no cerrado, nas áreas de transição e na Amazônia, o que afeta a produtividade e a sustentabilidade da pecuária nacional. As estimativas para o Brasil chegam em 70 milhões de hectares de pastagens degradadas (FAO 2008).

O desenvolvimento de tecnologias para recuperar áreas de pastagens abandonadas e degradadas, através do uso de sistemas agro silvo pastoris, como alternativa para minimizar a pressão de desmatamento sobre novas áreas, pode proporcionar desenvolvimento social, econômico e é ecologicamente sustentável para os agricultores.

A replantação da vegetação nativa ou a adaptação de espécies exóticas possibilita a produção de matéria orgânica, bem como, a recuperação da comunidade microbiana do solo, que possuem papel fundamental nas transformações que equilibram e sustentam os ecossistemas naturais e cultivados (MASCHIO *et al.*, 1992).

Os microrganismos do solo são responsáveis pela decomposição da matéria orgânica, mineralização e transferência de nutrientes entre os diferentes compartimentos do solo, controle biológico de patógenos, produção de substâncias promotoras de crescimento, fixação biológica de nitrogênio atmosférico e degradação de substâncias tóxicas no solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A microbiota do solo também contribui com a liberação gradativa e contínua de nutrientes da matéria orgânica para as plantas e após a morte dos microrganismos, parte do conteúdo celular também se torna disponível às plantas (TURNER *et al.*, 2003).

Além da busca da diversidade entre as espécies vegetais, a recuperação da biodiversidade dos microrganismos e da fauna do solo é questão importante na busca da sustentabilidade. Em solos degradados, os níveis de carbono no solo são baixos e a recuperação de áreas pode oferecer uma alternativa para o sequestro de carbono, no combate as mudanças climáticas globais (LAL, 2004).

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi comparar e diferenciar a diversidade da comunidade bacteriana de solos de cerrado com diferentes usos ó pastagem em uso, pastagem com plantio de arbóreas e uma área de cerrado sentido restrito como referência.

Para tanto, foram formuladas as seguintes hipóteses:

A composição da comunidade bacteriana é diferente devido:

1. A conversão do solo para cultivo de pastagens causa alterações físicas e químicas que podem alterar a diversidade bacteriana do solo;
2. A entrada de nutrientes diferenciada em cada área e o histórico de uso torna-se fator determinante na diferenciação da comunidade bacteriana do solo.

## 3.2. Material e métodos

### 3.2.1. Descrição da área de estudo

O município de Paracatu, estado de Minas Gerais, localiza-se na sub-bacia do rio Paracatu, onde a agropecuária é a principal atividade econômica com produção de hortifrutigranjeiros, cana-de-açúcar, soja, trigo e diversos tipos de rebanhos (IBGE, 2012).

A precipitação total nas áreas da Fazenda Jéssica, em Paracatu, MG no período do estudo foi de 1409,7 mm, medido por uma estação do INMET, para o município.

Segundo a classificação climática de Köppen, o clima da região é do tipo AW, clima tropical úmido de savana, com inverno seco e verão chuvoso. A precipitação anual média está entre 1100 a 1600 mm com duas estações bem definidas: seca e chuvosa. A estação seca ocorre de maio a setembro e a chuvosa de outubro a abril, quando ocorre mais de 90% da precipitação anual.

Os índices pluviométricos mensais registrados pelo Instituto Nacional de Meteorologia ([www.inmet.gov.br](http://www.inmet.gov.br), em 01/06/2012) para o período de janeiro de 2010 a dezembro de 2010 estão apresentados na Figura 32.

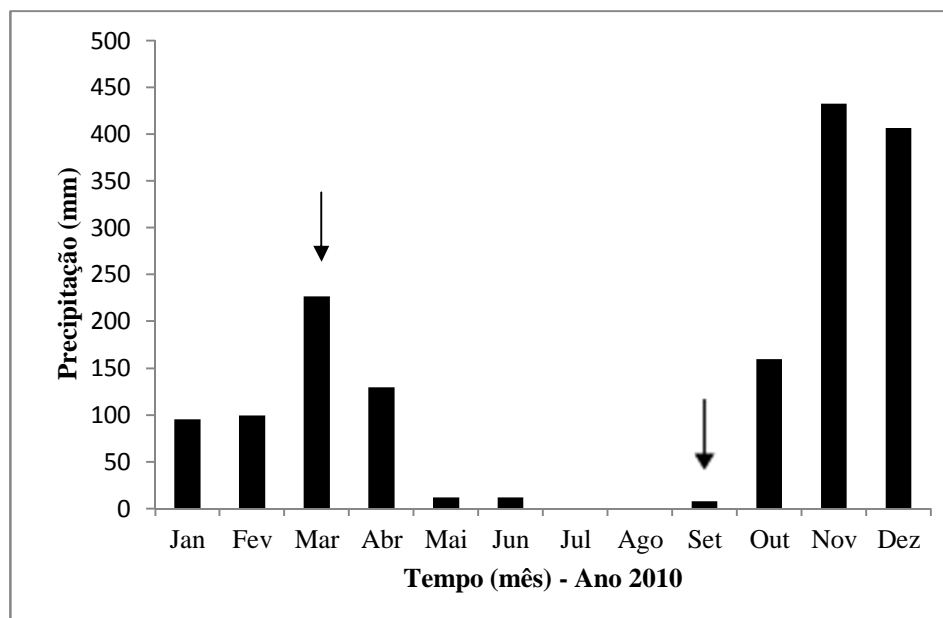


Figura 32. Distribuição da precipitação mensal (mm) durante o período de janeiro de 2010 a dezembro de 2010. Dados do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET, Paracatu, MG). As setas representam os meses de coleta.

O experimento de recuperação de área de reserva legal com arbóreas foi estabelecido em uma fazenda, denominada Fazenda Jéssica, localizada entre as coordenadas 17°16'04.4" de latitude Sul e 46°52'14.5" de longitude Oeste. A área da fazenda se encontra na micro bacia do Córrego Rico, bacia do rio Paracatu. A recuperação foi estabelecida em uma área utilizada como pastagem, formada com *Brachiaria brizantha*.

O local da área de estudo possui a fitofisionomia de cerrado sentido restrito, formação fisionômica vegetal que caracteriza os cerrados do Brasil Central, ocupando aproximadamente 43% da região (EITEN, 1972). O solo das parcelas foi classificado como Latossolo Vermelho, com textura muito argilosa.

Nesta fazenda, três parcelas, representando pastagem em uso, pastagem a ser recuperada com arbóreas e uma parcela controle, com vegetação nativa e fitofisionomia de cerrado sentido restrito foram selecionadas (Figura 33).

Para o plantio das árvores na área para recuperação foram estabelecidas diferentes composições de espécies nativas definidas com base em inventários previamente realizados em nível regional (SILVA JÚNIOR, 2007; FELFILI *et al.* 1995, 1994). As mudas foram produzidas no viveiro do Centro de Referência em Recuperação de Áreas Degradadas (CRAD ó UnB) e no Viveiro do IEF-MG em Paracatu, parceiro do grupo e responsável por um viveiro de mudas naquela cidade que tem a missão de produzir mudas para apoiar projetos e produtores rurais.

O projeto na fazenda Jéssica foi iniciado em março de 2009, com a avaliação, preparo das áreas e seleção das mudas a serem plantadas. O plantio foi realizado em outubro de 2009.

Os plantios foram mistos com espécies nativas, priorizadas aquelas de uso múltiplo, medicinais e alimentares que agreguem valor às reservas legais e tragam renda aos proprietários rurais e aquelas com funções ecossistêmicas importantes. Foram plantadas 1505 mudas, abrangendo 30 espécies (Tabela 3). As mudas foram plantadas em covas com adubação orgânica ao redor. Dois litros de esterco curtido foram adicionados, em quatro covas, distantes 50 cm das plantas e com 10 cm de profundidade por 20 cm de largura em torno da planta. A palha de milho foi colocada em um raio de 50 cm ao redor da planta e sobre a palha foi depositado um pouco de solo para que evitar a retirada da palha com o vento. A área total plantada foi de 1,5 ha. Para evitar o pastejo de animais, a área foi cercada.



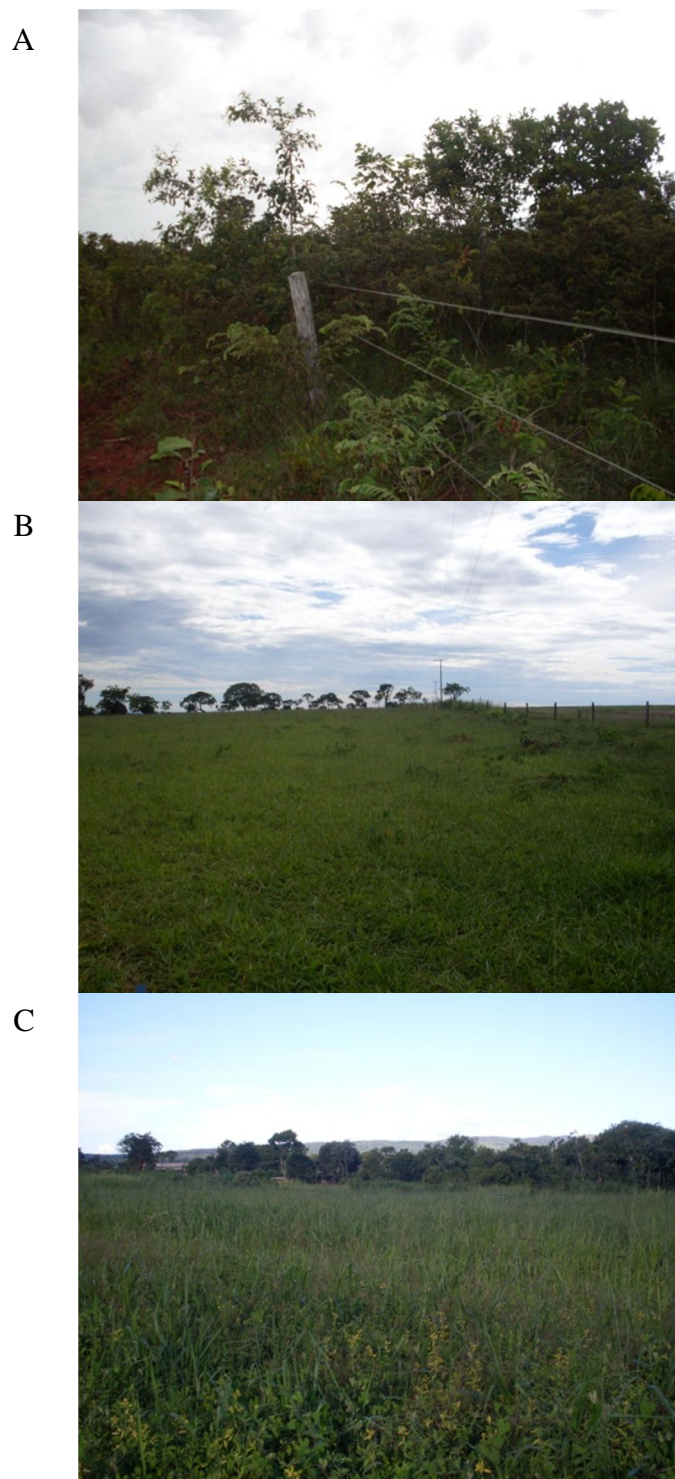


Figura 33. Áreas da fazenda Jéssica, em Paracatu, Minas Gerais. (A) Área de cerrado sentido restrito; (B) Área de pastagem em uso; (C) Área de pastagem com plantio de arbóreas.

Tabela 3: Lista das espécies arbóreas utilizadas no plantio da área em recuperação da fazenda Jéssica, em Paracatu, Minas Gerais.

Nome comum	Nome científico	Família
Açoita cavalo	<i>Luehea grandiflora</i>	Tiliaceae
Albizia	<i>Albizia polycephala</i>	Leguminosae
Cerejeira	<i>Amburana cearensis</i>	Fabaceae
Angico monjolo	<i>Parapiptadenia zehntneri</i>	Leguminosae
Angico vermelho	<i>Anadenanthera macrocarpa</i>	Leguminosae
Cortiça	<i>Apeiba tibourbou</i>	Tiliaceae
Aroeira	<i>Lithraea molleoides</i>	Anacardiaceae
Baru	<i>Dipteryx alata</i>	Leguminosae
Cagaita	<i>Eugenia dysenterica</i>	Myrtaceae
Caixeta	<i>Croton salutaris</i>	Euphorbiaceae
Camboatã	<i>Matayba elaeagnoides</i>	Sapindaceae
Capitão	<i>Terminalia argentea</i>	Combretaceae
Caviúna	<i>Dalbergia miscolobium</i>	Leguminosae
Caroba	<i>Jacaranda micrantha</i>	Bignoniaceae
Cedro	<i>Cedrela tubiflora</i>	Meliaceae
Chichá	<i>Sterculia chicha</i>	Sterculiaceae
Embaúba	<i>Cecropia pachystachya</i>	Cecropiaceae
Faveira	<i>Dimorphandra mollis</i>	Leguminosae
Gonçalo	<i>Astronium graveolens</i>	Leguminosae
Ipê amarelo	<i>Tabebuia serratifolia</i>	Bignoniaceae
Jatobá m	<i>Hymenaea courbaril</i>	Fabaceae
Jenipapo	<i>Genipa americana</i>	Rubiaceae
Mata cachorro	<i>Simarouba versicolor</i>	Simaroubaceae
Mutamba	<i>Guazuma ulmifolia</i>	Sterculiaceae
Paineira	<i>Chorisia speciosa</i>	Bombacaceae
Pau d'óleo	<i>Copaifera lucens</i>	Leguminosae
Pau-formiga	<i>Triplaris brasiliensis</i>	Polygonaceae
Pau-santo	<i>Kielmeyera marauensis</i>	Guttiferae
Tinguí	<i>Magonia pubescens</i>	Sapindaceae
Vinhático	<i>Plathymenia reticulata</i>	Leguminosae

### 3.2.2. Coleta das amostras de solo

As áreas selecionadas foram amostradas nos meses de março (final da estação chuvosa) e setembro (final da estação seca) de 2010. No mês de março, quando foi realizada a primeira coleta (31/03/2010), a precipitação foi de 226,5 mm. Para o mês de setembro, foi de 7,7 mm. Até a data da segunda coleta (22/09/2010), não havia precipitação acumulada no período.

As amostras de solo foram coletadas com trado com 5 cm de diâmetro em profundidade entre 0-10 cm. Na parcela de pastagem com arbóreas, as coletas foram feitas na área próxima a planta.

Em cada área foram demarcados três transectos, onde foram coletadas dez amostras em cada transecto. A distância entre cada transecto foi de 50 m e a distância entre os pontos de 5 m. No total, por transecto foram coletadas 30 amostras de solo. As amostras que foram coletadas na área com plantio de arbóreas, foram coletadas a 40 cm de distância da planta.

As amostras utilizadas para as análises foram compostas por 3 e 4 pontos de solo coletado. No primeiro transecto, selecionamos os pontos 3, 6 e 9; no segundo, 4, 7 e 10, e no terceiro, 2, 5, 8 e 10. Essas amostras foram compostas, representando um ponto por transecto. Assim, foi possível obter 3 amostras por linha (Figura 34).

Após as coletas, em campo, as amostras destinadas às análises moleculares, pH e análise de nutrientes foram acondicionadas em sacos plásticos e mantidas refrigeradas. Para determinação do conteúdo gravimétrico as amostras foram acondicionadas em latas de alumínio e vedadas.

Ao chegar ao laboratório, as amostras destinadas às análises moleculares foram peneiradas através de malha de 2 mm, fracionadas em pequenas quantidades e congeladas em freezer -20°C. As amostras utilizadas para determinação de pH e análise de nutrientes foram peneiradas, secas em temperatura ambiente e armazenadas para as análises.

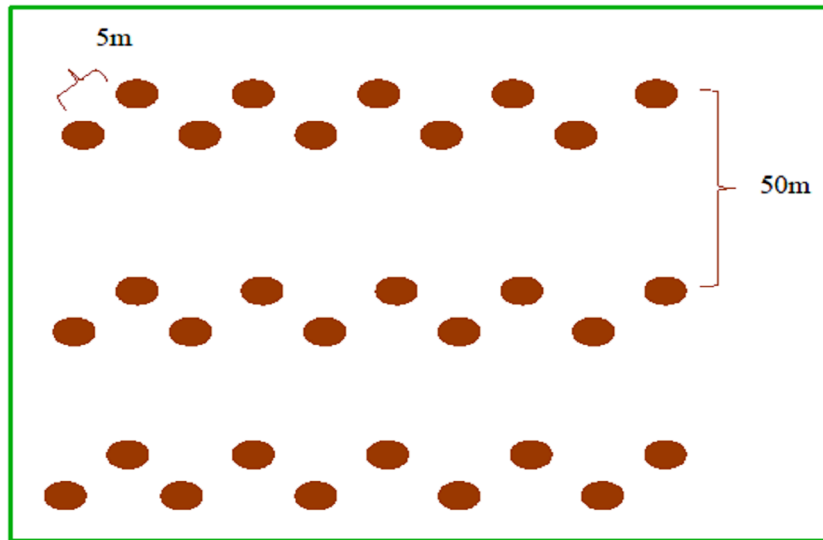


Figura 34. Esquema referente às coletas de solo realizadas em Paracatu, Minas Gerais.

### 3.2.3. Análises físico-químicas do solo

Os valores de pH do solo foram obtidos em água destilada e  $\text{CaCl}_2$  (0,01 M) na proporção 1:2,5. Após a agitação com bastão de vidro e repouso por 30 minutos foi realizada a leitura do pH, com auxílio de um potenciômetro.

As análises químicas do solo foram realizadas na Universidade Federal de Viçosa (UFV-MG), no laboratório de Solos Florestais. Os elementos P, K foram extraídos com o extrator Mehlich1 e os elementos Ca, Mg e Al com o extrator KCl (1mol/L). O carbono orgânico foi determinado pelo método Walkley-Black. A concentração de P disponível foi determinada por colorimetria, K trocável por fotometria de chama, Ca e Mg trocáveis por espectrofotometria de absorção atômica. O elemento Al por titulometria. As análises realizadas seguiram o protocolo estabelecido por EMBRAPA (1997).

O teor gravimétrico de água no solo foi determinado pela diferença entre o peso fresco e o peso seco do solo, após ter sido mantido em estufa a  $105^\circ \text{C}$  até peso constante.

A análise de textura das amostras de solo foi realizada com o método do densímetro (BOUYOUCOS, 1926).

### 3.2.4. Análises da comunidade bacteriana do solo

A extração de DNA total das amostras de solo foi feita através do kit FastDNA SPIN para extração de DNA de microrganismos em amostra de solo, marca MP Bio, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante, com uso do equipamento Fast Prep<sup>®</sup> 24 (MP Bio, USA). O produto da extração foi avaliado por eletroforese em gel de agarose 0,8 % contendo brometo de etídeo (2 g/ml) e o seu tamanho estimado por comparação com o marcador 1kb *plus ladder* (USB-EUA).

Para as análises de pirosequenciamento, os fragmentos de 16S rDNA das amostras de solo de cada área tratamento (cerrado, pastagem com plantio de arbóreas e pastagem em uso) foram amplificados utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores que flanqueiam as regiões hipervariáveis V5 a V9 do 16S rRNA (ARMOUGON & RAOULT, 2009). Os pares de oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram 787F (5' ATTAGATACCCNGGTAG - 3') e 1492 R (5' GNTACCTTGTTACGACTT - 3'), com os adaptadores A ou B da 454 Life Sciences - (ROESCH *et al.*, 2007).

A amplificação por PCR das sequências de 16S rDNA com 20  $\mu$ l de volume total de reação foi realizada através do protocolo: tampão de Taq polimerase 1X (Invitrogen); 3,0 mM de MgCl<sub>2</sub>; 10  $\mu$ mol de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,25 mM de dNTPs; 1,5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1  $\mu$ l de DNA. As concentrações das amostras de DNA variaram entre 1,08 ng/ $\mu$ l a 6,75 ng/ $\mu$ l em 25  $\mu$ l. A amplificação foi realizada utilizando desnaturação inicial de 3 min a 95°C, seguido por 25 ciclos com desnaturação por 30 segundos a 95°C, anelamento por 30 segundos a 58°C e extensão por 1,4 minutos a 72 °C, seguido por uma extensão final de 7 minutos a 72°C e resfriamento a 10°C. Os amplicons foram sequenciados por meio do sequenciador de nova geração GS FLX Titanium (454 Sequencing Center, Brandford, USA).

O processamento dos dados foi realizado por meio do *pipeline Qiime* (CAPORASO *et al.*, 2010). Sequências menores que 130 bp e com índice de qualidade inferior a 30 foram removidas. As sequências foram separadas por amostras através dos barcodes com 10 pb e depois agrupadas em filotipos usando Cd-hit (LI & GODZIK, 2006) com limiar de  $\times$  97% de similaridade entre as sequências. Sequências representativas foram classificadas usando Uclust contra o conjunto de dados básicos do

RDP (*Ribosomal Database Project*). Os testes estatísticos sobre as diferenças taxonômicas entre as amostras foram calculados por meio do programa STAMP (PARKS & BEIKO, 2010).

### **3.2.5. Análises estatísticas**

O modelo linear misto (LME) proposto por Laird & Ware (1982) foi utilizado para análise dos dados, por possuírem medidas repetidas ao longo do tempo, com fatores fixos e aleatórios.

Para a utilização do modelo, usamos o fator "estação" como fixo, pois foram realizadas duas medições na mesma área em épocas diferentes. Os outros dados foram tratados como fatores aleatórios.

Os dados relativos para as análises de solo, como pH, conteúdo gravimétrico de água e nutrientes foram testados quanto à sua normalidade e homocedacidade. Somente os valores de pH precisaram de transformação logarítmica. Diferenças a 5 % de probabilidade foram consideradas significativas. As análises estatísticas foram realizadas no programa R (versão 2.13.0, pacote NLME 2.13.2 - R *Development Core Team* 2008).

### 3. Resultados

#### 3.3.1. Características físico-químicas do solo

O conteúdo gravimétrico na profundidade 0-10 cm respondeu às variações da precipitação durante os meses coletados (março e setembro) (Figura 32). O teor de umidade médio do solo variou entre 25,5% (março de 2010) a 13,4% (setembro de 2010) na área de cerrado sentido restrito e de 16,9% (março de 2010) a 10% (setembro de 2010) na área de pastagem em uso. Na área de pastagem com arbóreas os valores variaram entre 21,7% (março de 2010) a 9,35% (setembro de 2010) (Figura 35 A). Diferenças significativas foram observadas entre as estações, chuvosa e seca ( $p < 0,05$ ).

Quando comparados, os valores de  $\text{pH}(\text{H}_2\text{O})$  dos solos entre as áreas, o solo sob cerrado apresentou valores mais baixos em relação as áreas de pastagem em uso e pastagem com arbóreas (Figura 35 B). Os valores médios de  $\text{pH}(\text{CaCl}_2)$  (Figura 35 C) do solo de cerrado sentido restrito foram menores que os das áreas de pastagem em uso e pastagem com arbóreas. As diferenças ocorreram entre as parcelas e entre as estações, chuvosa e seca. Houve efeito significativo da época de amostragem dos solos, sendo que os valores mais elevados foram encontrados na estação chuvosa. Os valores das áreas de pastagem foram maiores que o de cerrado. Na estação seca não houve diferenças entre os valores.

Após as análises de texturas, os solos das três áreas foram classificados como tendo textura muito argilosa, segundo o diagrama triangular simplificado para a classificação textural do solo.

As análises das características químicas dos solos estão apresentadas nas figuras 36, 37 e 38. As concentrações de P disponível no solo foram significativamente diferentes entre os tratamentos, não variando, entretanto, entre as estações. A área de cerrado sentido restrito apresentou os menores valores, variando entre 1,16 a 1,57  $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  nas estações chuvosa e seca. A área de pastagem em uso apresentou valores variando entre 1,97 e 2,1  $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Para a área de pastagem com arbóreas foram encontrados os maiores valores para P disponível, variando entre 3,54 e 4,40  $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ .

As concentrações de K disponível não apresentaram diferenças entre as áreas estudadas, com valores variando entre 109,67 a 160  $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ . O conteúdo de Ca nas áreas foi significativamente diferente quando comparamos a área de cerrado sentido

restrito com as áreas de pastagem em uso e pastagem com arbóreas, nas duas estações, chuvosa e seca. Entretanto, não houve diferenças entre as duas áreas de pastagem.

As análises mostraram diferenças nas concentrações de Mg disponível no solo, onde a área de cerrado sentido restrito apresentou os menores valores quando comparado às áreas de pastagem. Entre as áreas de pastagem não houve diferenças entre os valores.

As concentrações de Al no solo foram significativamente diferentes quando as áreas de cerrado, pastagem em uso e pastagem com arbóreas foram comparadas. A área de cerrado apresentou valores maiores tanto para a estação chuvosa ( $1,30 \text{ cmol}_e/\text{dm}^3$ ), quanto para a seca ( $0,94 \text{ cmol}_e/\text{dm}^3$ ). Os valores de CTC foram diferentes somente entre a área de cerrado e as áreas de pastagem, tanto nas estações chuvosa, quanto na seca.

Para os valores de MO do solo não houve diferenças significativas entre as áreas.

A análise dos componentes principais com os parâmetros químicos dos solos amostrados (Figura 39 A e B) agruparam as áreas de cerrado sentido restrito no mesmo quadrante, separando as áreas de pastagem em uso e pastagem com arbóreas. A separação entre os quadrantes ocorreu também em relação às estações, chuvosa e seca.



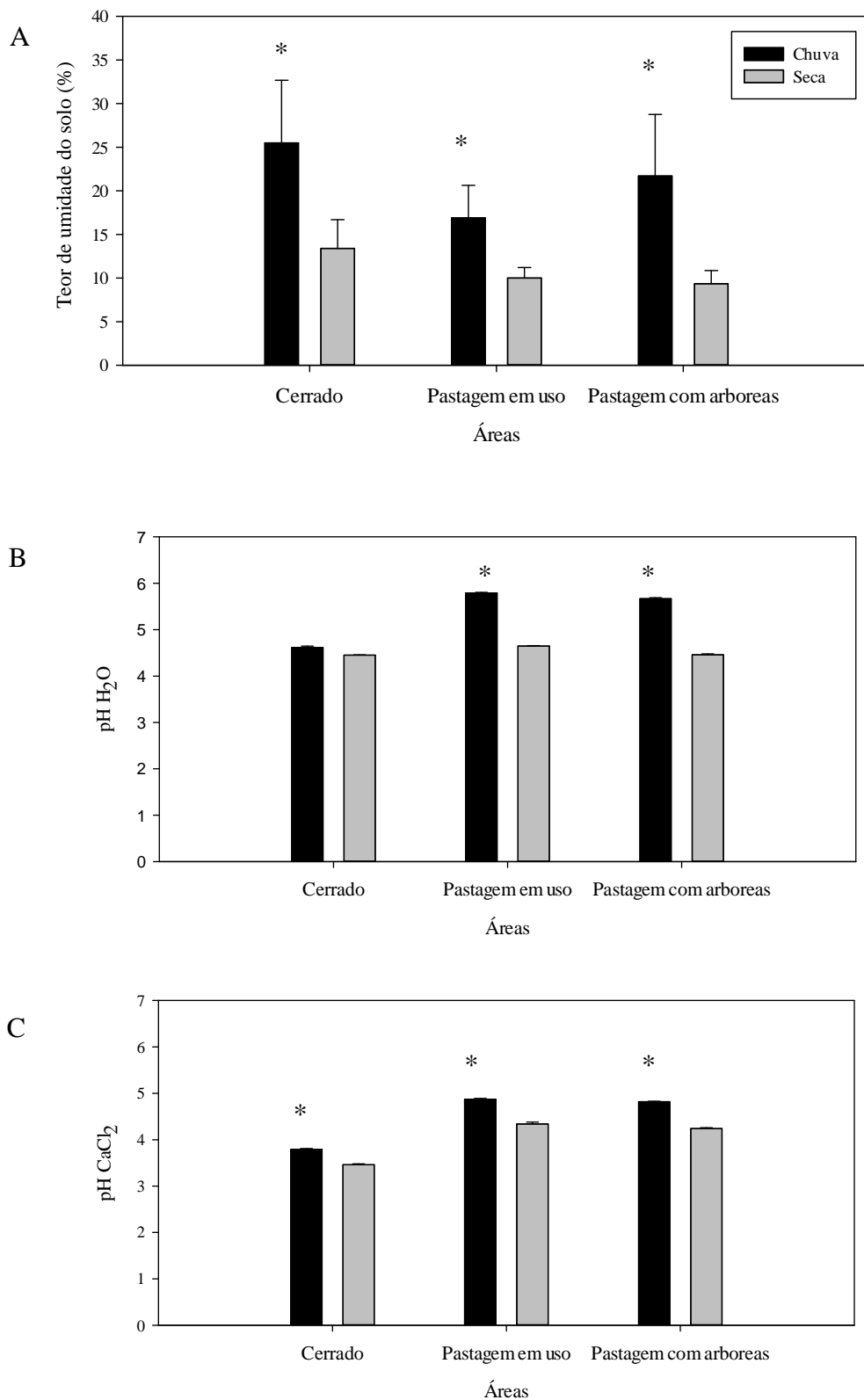


Figura 36. Valores médios do teor de umidade no solo (%), pH em água e CaCl<sub>2</sub> obtidos em áreas de cerrado *sentido restrito*, pastagem em uso e pastagem com arbóreas (n=3), no intervalo de 0 a 10 cm de profundidade do solo, nos meses de março e setembro de 2010 (estações chuvosa e seca). As barras verticais representam os desvios padrão. Diferenças significativas entre as áreas estão indicadas por asteriscos (\* = 5%).

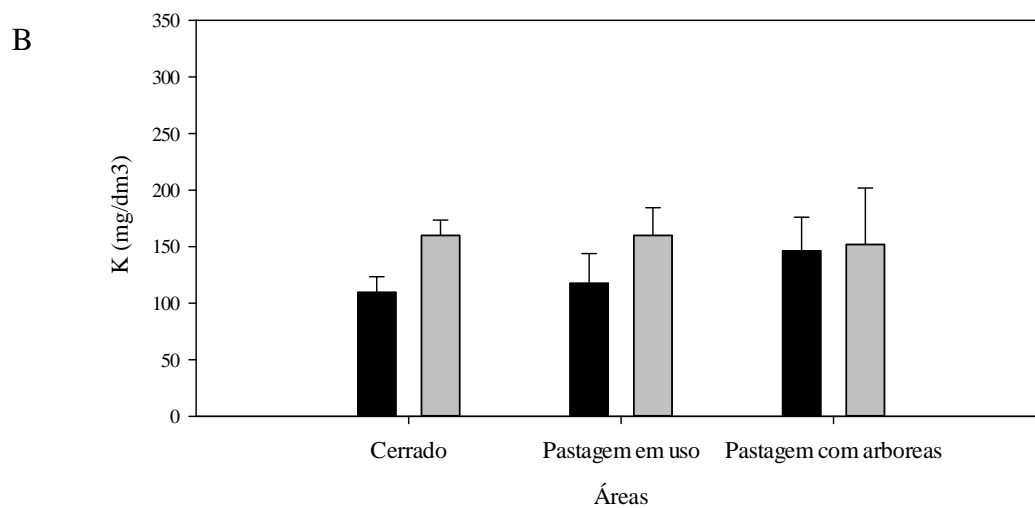
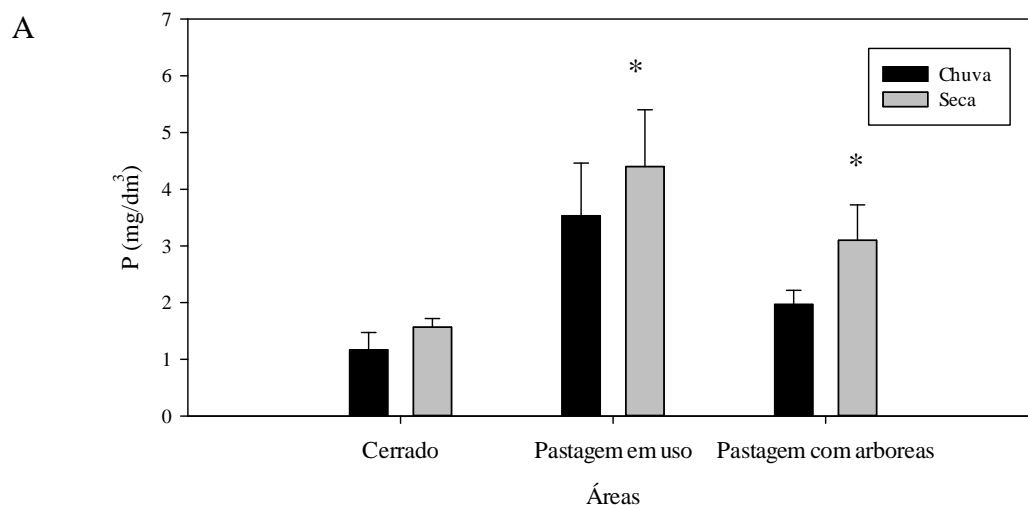


Figura 37. Concentrações de P ( $\text{mg}/\text{dm}^3$ )(A), K ( $\text{mg}/\text{dm}^3$ )(B) disponíveis no solo para as áreas de cerrado sentido restrito, pastagem em uso e pastagem com arbóreas ( $n=3$ ). As barras verticais representam o desvio padrão das médias. Diferenças significativas entre as áreas estudadas estão indicadas por asteriscos (\* = 5 %).

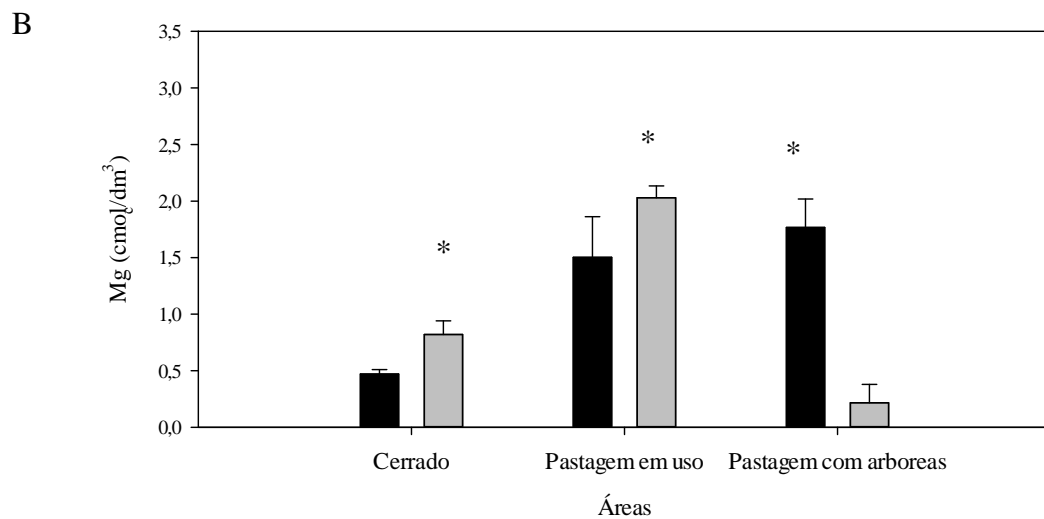
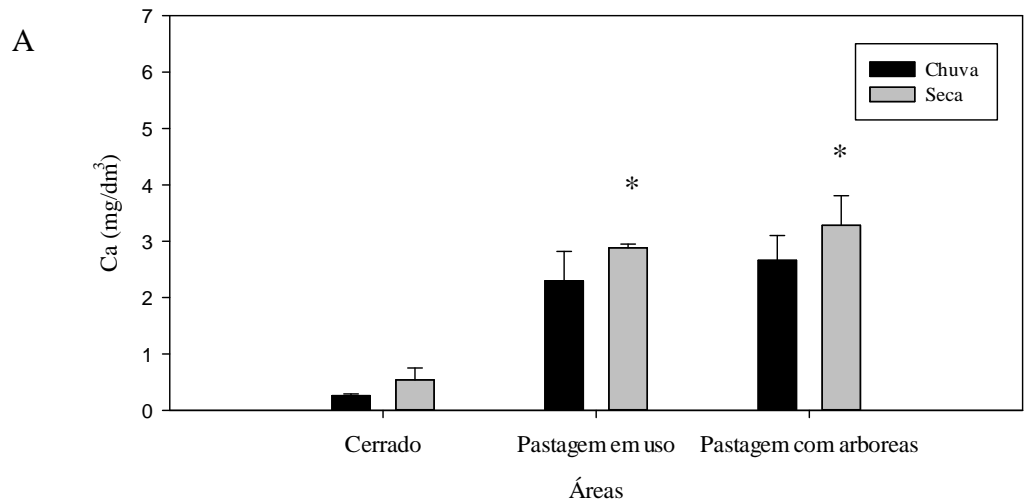


Figura 38. Concentrações de Ca (mg/dm<sup>3</sup>)(A) e Mg (cmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup>)(B) disponíveis no solo para as áreas de cerrado sentido restrito, pastagem em uso e pastagem com arbóreas (n=3). As barras verticais representam o desvio padrão das médias. Diferenças significativas entre as áreas estudadas estão indicadas por asteriscos (\* = 5 %).

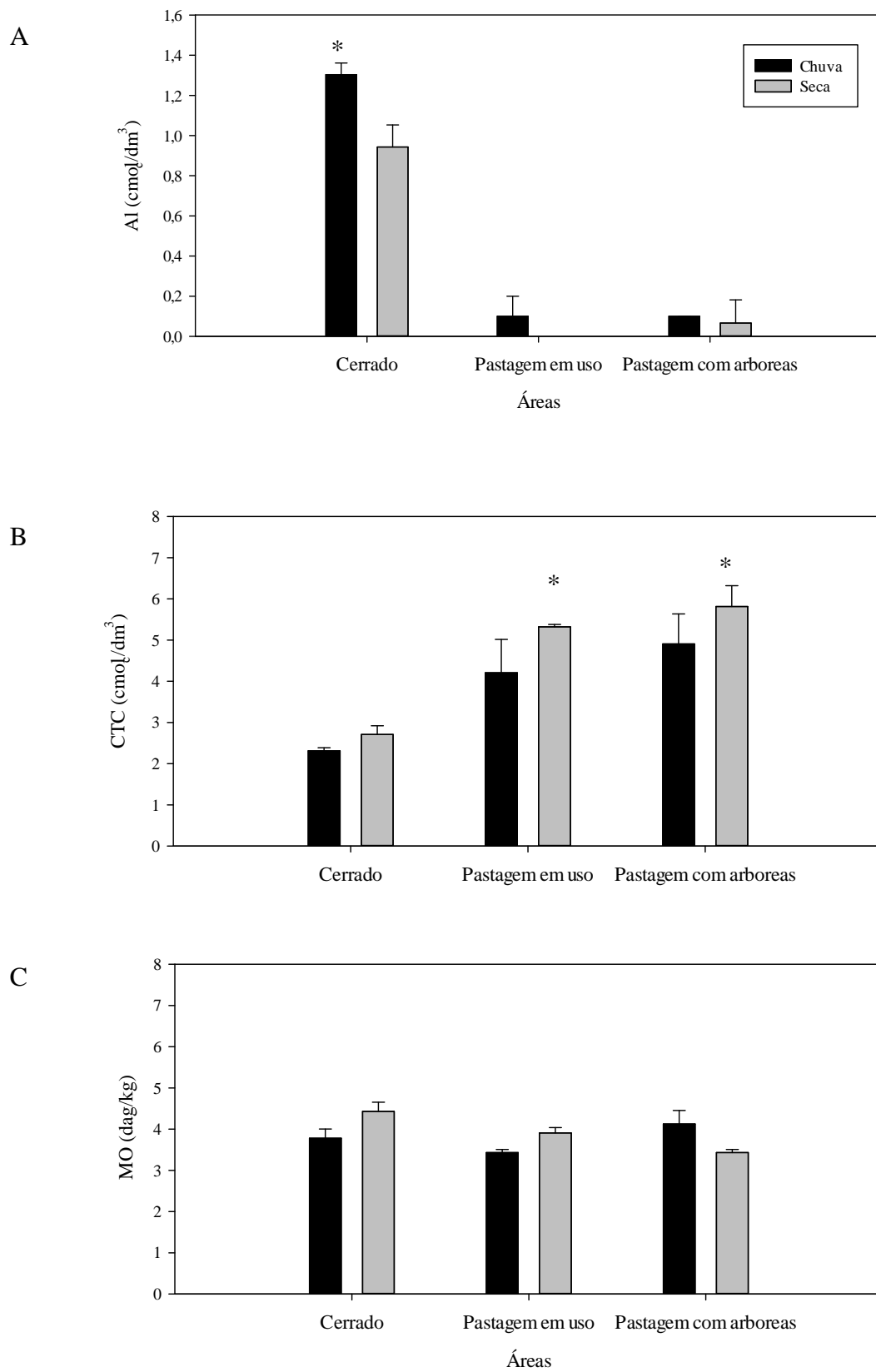


Figura 39. Concentrações de Al ( $\text{cmol}/\text{dm}^3$ ) (A), CTC ( $\text{cmol}/\text{dm}^3$ ) (B) e MO ( $\text{dag}/\text{kg}$ ) (C) disponíveis no solo para as áreas de cerrado sentido restrito, pastagem em uso e pastagem com arbóreas ( $n=3$ ). As barras verticais representam o desvio padrão das médias. Diferenças significativas entre as áreas estudadas estão indicadas por asteriscos (\* = 5 %).

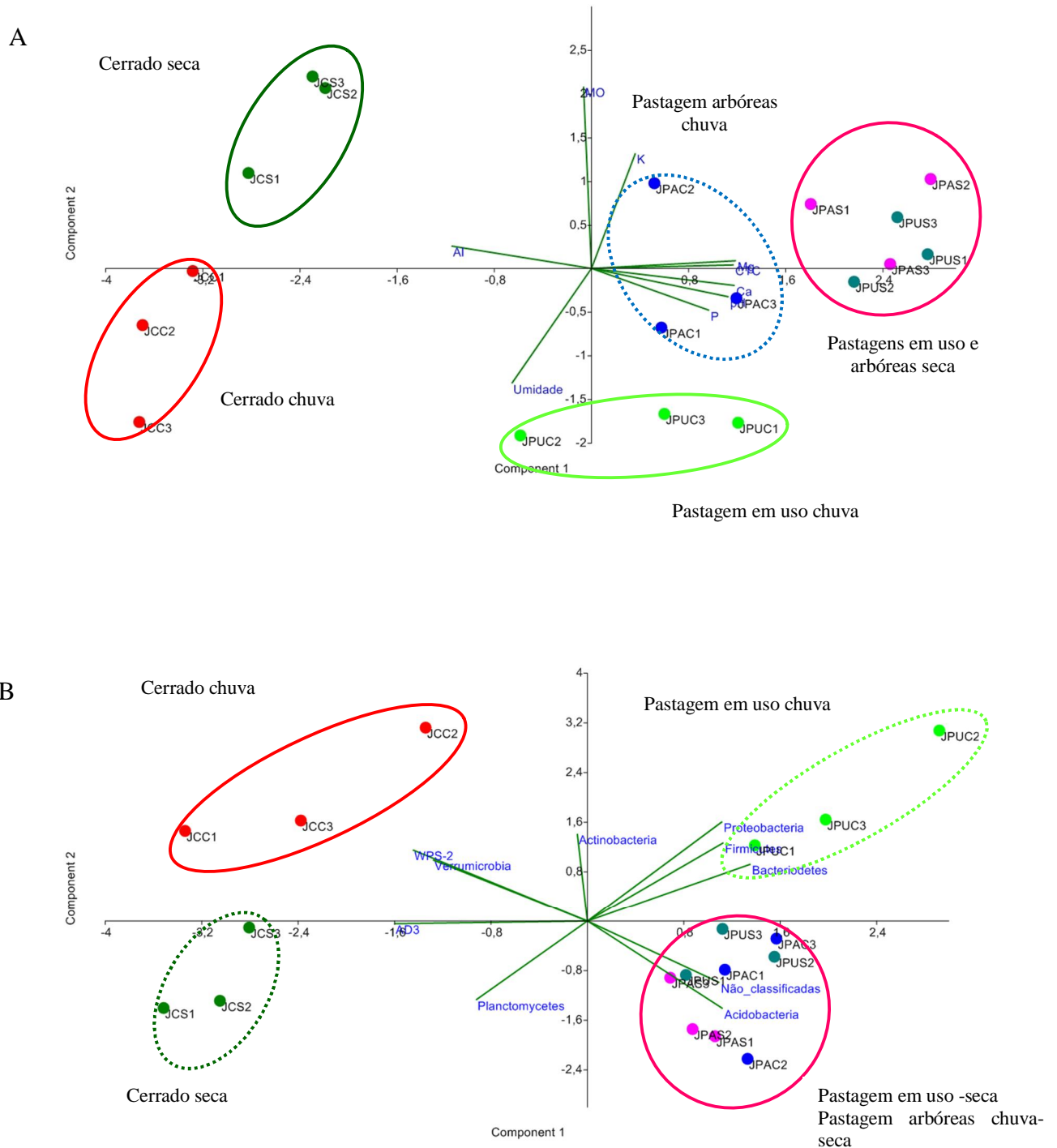


Figura 39. Análise dos componentes principais (PCA) dos parâmetros químicos dos solos analisados (A); Análise dos componentes principais (PCA) dos filós dominantes dos solos analisados (B). Legenda: JCC ó Jéssica cerrado chuva; JCS ó Jéssica cerrado seca; JPUC ó Jéssica pastagem em uso chuva; JPUS ó Jéssica pastagem em uso seca; JPAC ó Jéssica pastagem com arbóreas chuva; JPAS ó Jéssica pastagem com arbóreas seca. Os números 1, 2 e 3 correspondem às repetições realizadas.

### 3.2.2. Análises da comunidade bacteriana do solo

Após as análises de pirosequenciamento, obtivemos cerca de 126 000 sequências de alta qualidade para as áreas amostradas.

Usando a classificação do RDP II (*Ribosomal Database Project*), com um índice de confiança de 95%, um total de 18 filos foi identificado para as áreas de cerrado nativo, pastagem em uso e pastagem com arbóreas. Dez filos (AD3, Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Firmicutes, Planctomycetes e Proteobacteria) foram considerados abundantes. Consideramos abundantes os filos com frequência maior que 1% e oito filos foram considerados raros, com frequência menor que 1% (Armatimonadetes, Chlamydiae, Elusimicrobia, Gemmatimonadetes, SPAM, TM6, TM7 e WPS-2).

Analisamos os filos dominantes em todas as áreas, onde o grupo de  $\delta$ bactérias não classificadas e o filo Acidobacteria apresentaram a maior abundância, nas três áreas amostradas (Figura 40 A, B e C). Para os menos dominantes, os mais presentes foram o TM7 e WPS-2 (Figura 41 A, B e C).

O grupo de  $\delta$ bactérias não classificadas apresentou maior abundância para as áreas de cerrado sentido restrito e pastagem em uso, apresentando valores variando entre 19 e 31% e pastagem com arbóreas na estação seca, com valores em 29%.

Entre os filos, o filo Acidobacteria foi dominante nas três áreas amostradas, nas duas estações. Encontramos também sequências correspondentes a cinco grupos do filo Acidobacteria (Acidobacteria-5, Chloroacidobacteria, Solibacteres, Sva0725, iii1-8) e um grupo representativo (7,2%) não classificado.

As áreas estudadas apresentaram variações quanto à posição dos filos em relação à abundância, portanto serão descritos conforme as áreas amostradas: cerrado sentido restrito, pastagem em uso e pastagem com arbóreas. A ordenação dos filos segue a abundância apresentada para a área de cerrado sentido restrito.

A área de cerrado sentido restrito apresentou como segundo filo mais abundante, o filo Verrumicrobia com variações entre 7 e 11%. A maior abundância foi encontrada na estação chuvosa. Sequências das classes de Spartobacteria e Verrumicrobiae também foram observadas, além de uma classe Verrumicrobia não classificada.

O filo Proteobacteria foi o terceiro filo mais abundante, com valores entre 8 e 10%. Foram observadas sequências das classes Alphaproteobacteria,

Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria e Gammaproteobacteria, além de sequências de Proteobacteria não classificadas, nas estações chuvosa e seca.

O quarto filo com maior abundância foi o AD3 com valores entre 10 e 16%. Para este filo, a estação seca apresentou maior abundância. As classes ABS-6 e JG37-AG-4 também apresentaram sequências nas amostras analisadas.

Para a área de pastagem em uso, o segundo filo mais abundante foi o Proteobacteria, apresentando valores entre 10 e 13%. Também foram observadas sequências das classes Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria e Gammaproteobacteria, além de sequências de Proteobacteria não classificadas, nas duas estações amostradas.

O terceiro filo mais abundante foi o Firmicutes, apresentando maior abundância na estação chuvosa. O quarto filo mais abundante para a pastagem em uso foi o Actinobacteria.

Na área de pastagem com arbóreas, o segundo e o terceiro filamentos mais abundantes seguiram a mesma distribuição que a pastagem em uso, com os filamentos Proteobacteria e Firmicutes.

O quarto filo mais abundante foi Verrucomicrobia, apresentando valores variando entre 3,9 e 4,5% na área amostrada. Sequências das classes de Spartobacteria e Verrucomicrobiae também foram observadas, além de uma classe Verrucomicrobia não classificada.

Analizamos também a presença de filamentos menos dominantes (com frequência menor que 1 %) em todas as áreas (Figura 41). Dentre os filamentos considerados raros, os que apresentaram maior porcentagem de distribuição foi o TM7 e o WSP-2. Os filamentos raros encontrados estão presentes em todas as áreas amostradas, variando somente a abundância encontrada nas estações.

Comparando-se as frequências relativas dos filamentos bacterianos mais abundantes das áreas de cerrado sentido restrito, pastagem em uso e pastagem com arbóreas através do programa STAMP utilizando o teste ANOVA-Tukey-Kramer, os filamentos que apresentaram diferenças significativas foram: Acidobacteria e Planctomycetes (Figura 42). Para os filamentos menos abundantes, somente o filo Armatimonadetes (Figura 43).

Quando comparamos as frequências relativas dos filamentos bacterianos mais abundantes em relação às estações através do programa STAMP utilizando o teste ANOVA -Tukey-Kramer, os filamentos que apresentaram diferenças significativas foram os mesmos apresentados para as diferenças entre as áreas (Figura 44). Para os filamentos menos

abundantes, o resultado encontrado foi o mesmo que para os filos mais abundantes (Figura 45).

As diferenças entre a composição das comunidades bacterianas do solo das áreas amostradas (cerrado sentido restrito, pastagem em uso e pastagem com arbóreas) foi realizada através da Análise de Coordenadas Principais (PCoA) no programa Unifrac. Através destas análises podemos observar as separações entre as áreas. Realizamos análises com parâmetros *weighted* e *unweighted*, onde é avaliada a presença-ausência de sequências, e onde é avaliada a abundância relativa de cada grupo de sequências (Figura 46 A e B).

Com a análise PCoA *weighted* (Figura 46 A) os resultados mostram a separação bem definida das amostras de cerrado sentido restrito (estação chuvosa e seca) das demais amostras das áreas de pastagem. A área de pastagem em uso, estação chuvosa, também se separou das demais amostras.

Para a análise PCoA *unweighted* (Figura 46 B), as amostras referentes ao cerrado sentido restrito estações chuvosa e seca continuam separadas das demais amostras.

Em ambos os resultados de PCoA, as amostras JCC1 a 3 (estação chuvosa) e JCS1 a 3 (estação seca) para a área de cerrado sentido restrito estão separadas das outras áreas. Pastagem em uso, JPU1 a 3 (estação chuvosa) estão próximas nas análises *unweighted* e *weighted* (Figuras 46 A e B). As outras áreas amostradas não estão bem separadas, mostrando que para estas não existe um fator único de separação.



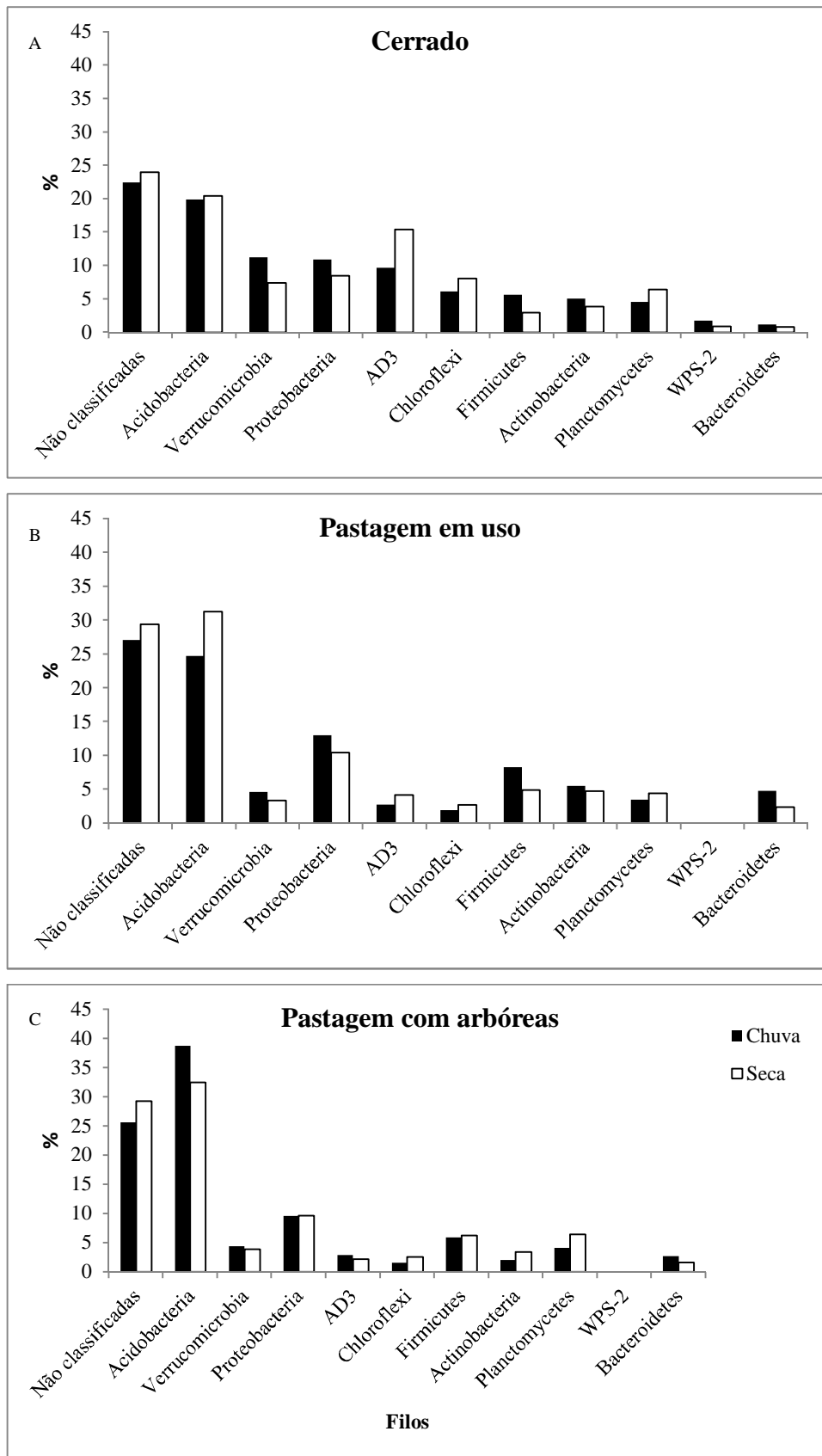


Figura 40. Frequência dos filós dominantes (> 1%) de acordo com as análises de pirosequenciamento na classificação do *Ribosomal Database Project* na área de cerrado sentido restrito(A), pastagem em uso (B) e pastagem com arbóreas (C). As áreas foram amostradas nas estações chuvosa (março 2010) e seca (setembro 2010).

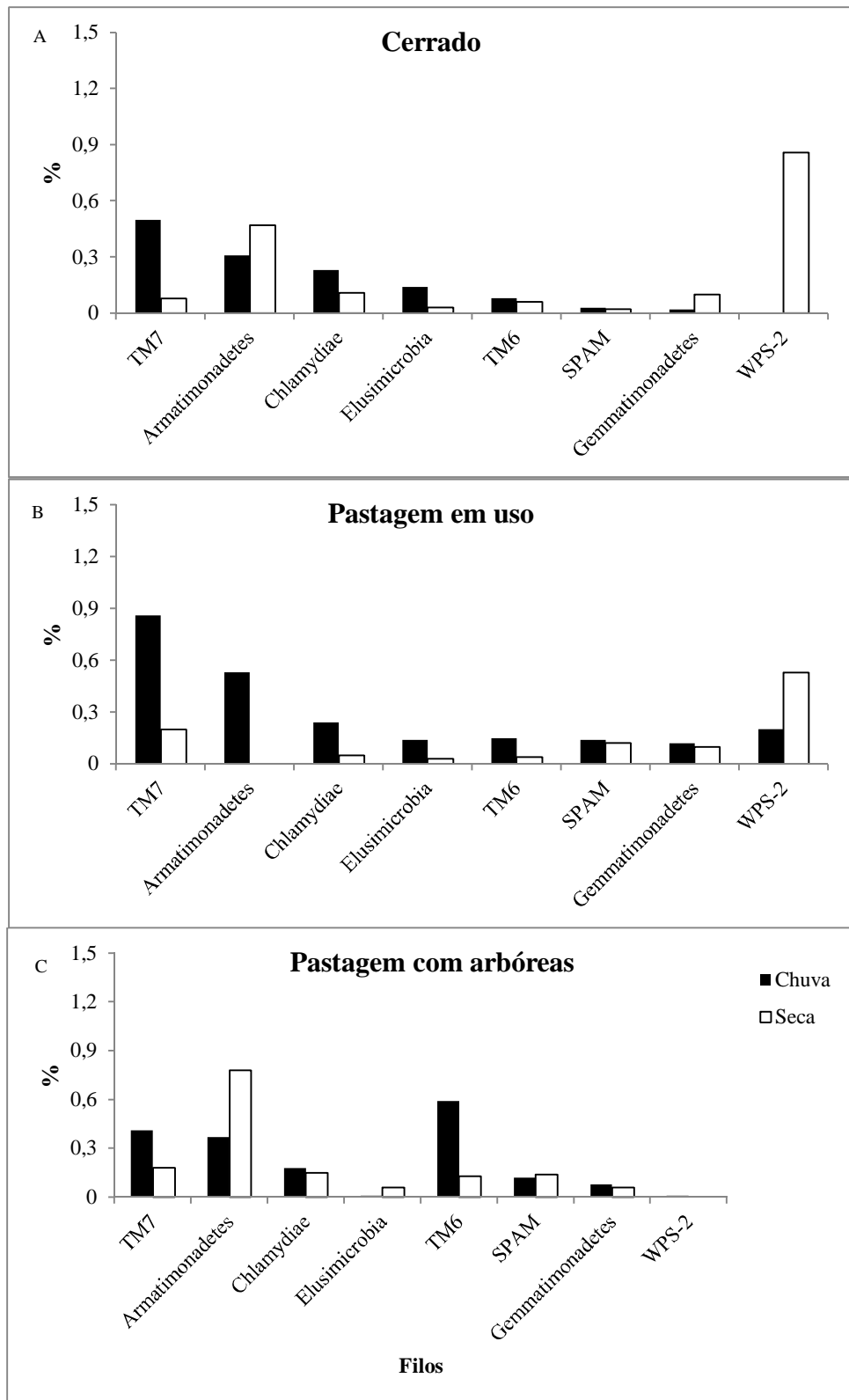


Figura 41. Frequência dos filios menos dominantes (< 1%) de acordo com as análises de pirosequenciamento na classificação do *Ribosomal Database Project* nas áreas de cerrado sentido restrito (A), pastagem em uso (B) e pastagem com arbóreas (C). As áreas foram amostradas nas estações chuvosa (março 2010) e seca (setembro 2010).

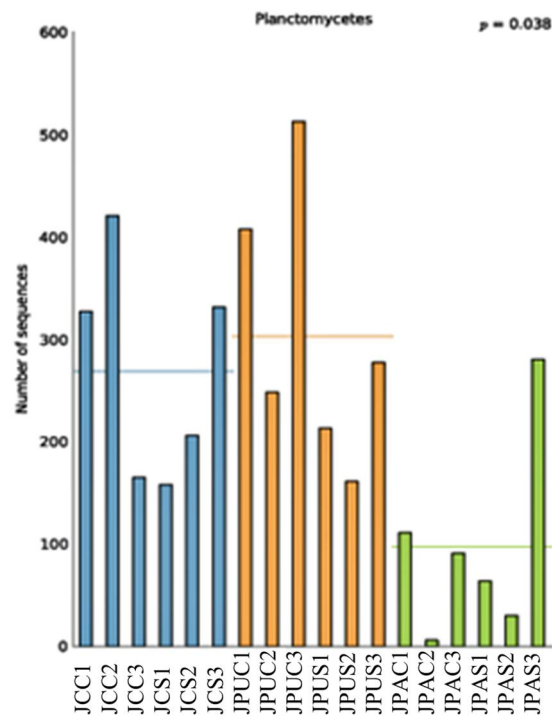
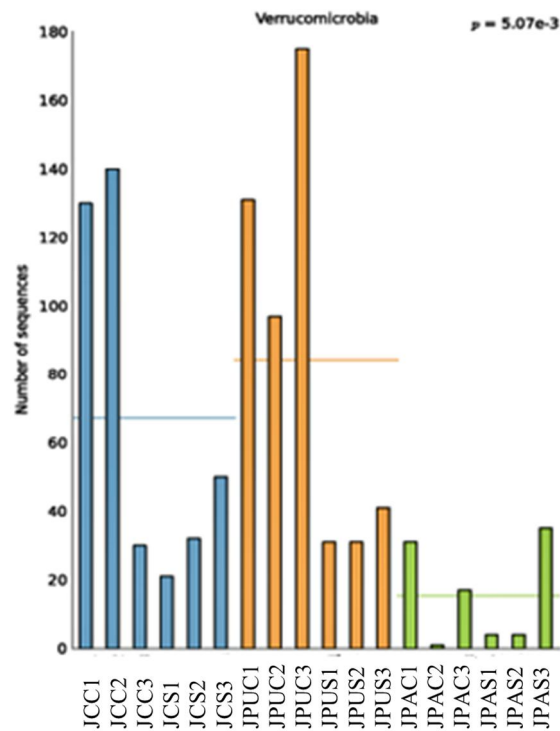


Figura 42. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os filos bacterianos mais abundantes das áreas de cerrado sentido restrito, pastagem em uso e pastagem com arbóreas, por meio do programa STAMP utilizando o teste ANOVA ukey-Kramer. O valor médio para cada grupo é demonstrado em forma de linha. Legenda: JCC ó cerrado chuva; JCS ó cerrado seca; JPUC- pastagem em uso chuva; JPUS ó pastagem em uso seca; JPAC ó pastagem com arbóreas chuva; JPAS ó pastagem com arbóreas seca. Números 1 a 3 representam as repetições das áreas.

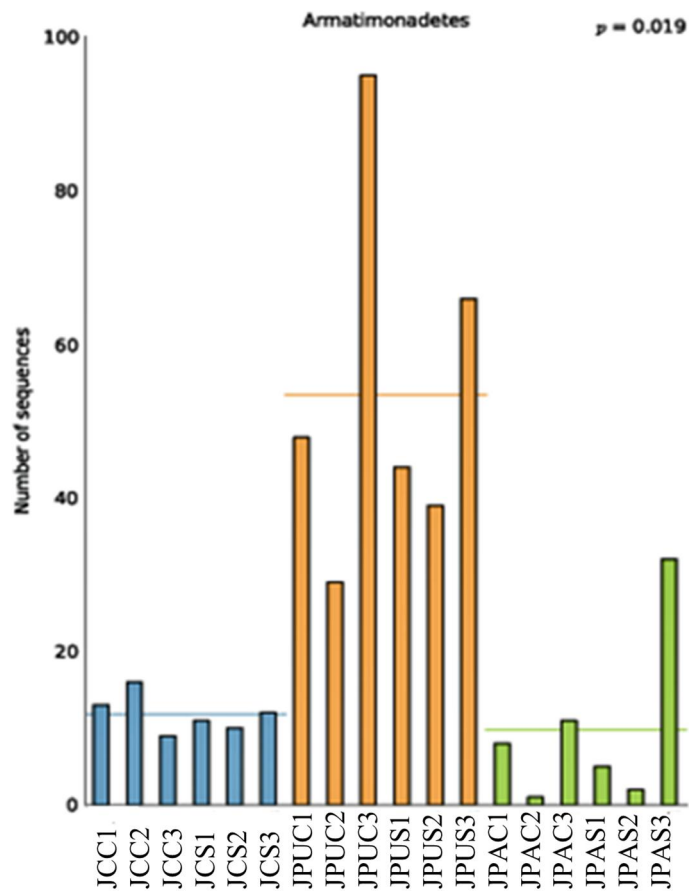


Figura 43. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os filos bacterianos menos abundantes das áreas de cerrado sentido restrito, pastagem em uso e pastagem com arbóreas, por meio do programa STAMP utilizando o teste ANOVA Tukey-Kramer. O valor médio para cada grupo é demonstrado em forma de linha. Legenda: JCC ó cerrado chuva; JCS ó cerrado seca; JPUC- pastagem em uso chuva; JPUS ó pastagem em uso seca; JPAC ó pastagem com arbóreas chuva; JPAS ó pastagem com arbóreas seca. Números 1 a 3 representam as repetições das áreas.

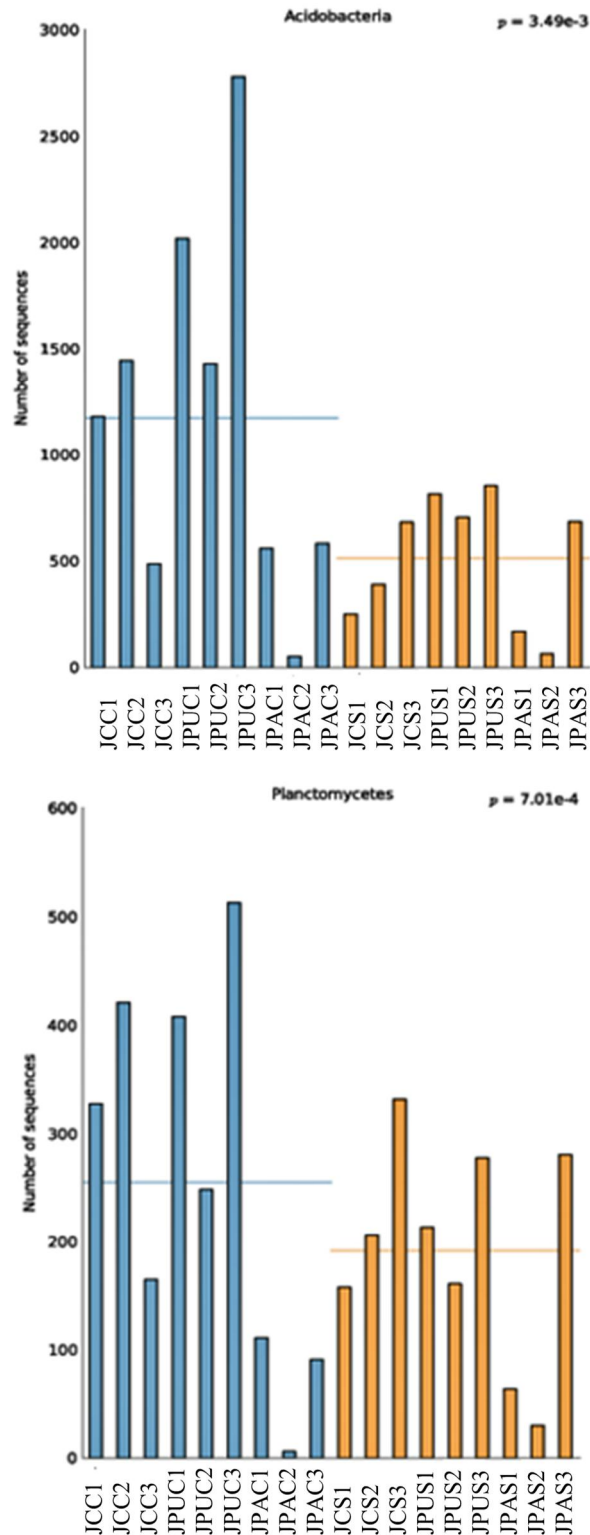


Figura 44. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as estações chuvosa (azul) e seca (marrom) dos filos bacterianos mais abundantes presentes no solo de cerrado sentido restrito, pastagem em uso e pastagem com arbóreas, por meio do *programa* STAMP utilizando o teste ANOVA Tukey-Kramer. O valor médio para cada grupo é demonstrado em forma de linha. Legenda: JCC ó cerrado chuva; JCS ó cerrado seca; JPUC- pastagem em uso chuva; JPUS ó pastagem em uso seca; JPAC ó pastagem com arbóreas chuva; JPAS ó pastagem com arbóreas seca. Números 1 a 3 representam as repetições das áreas.

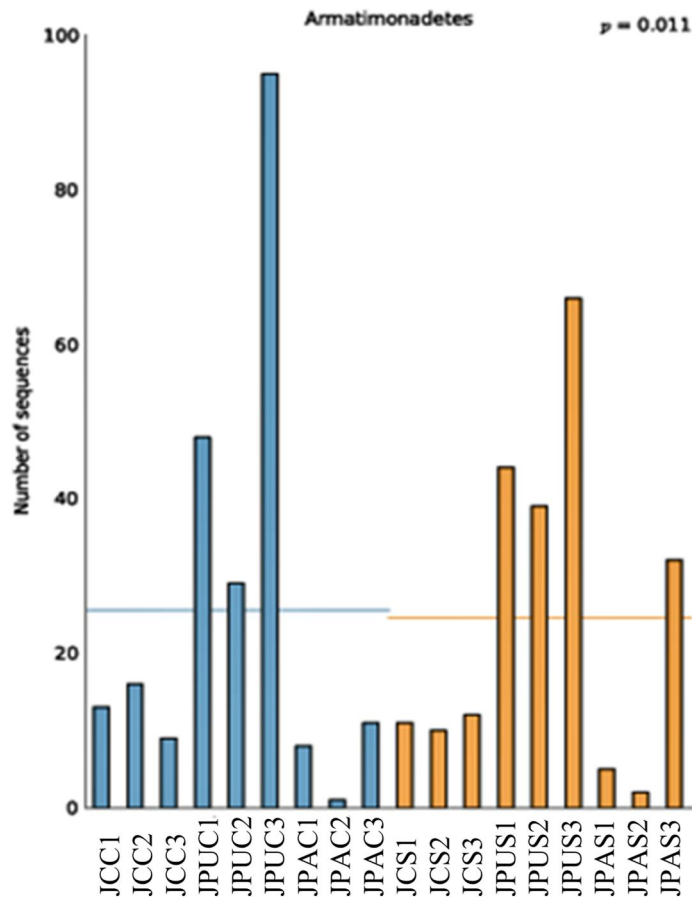


Figura 45. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as estações chuvosa (azul) e seca (marrom) dos filós bacterianos menos abundantes presentes no solo de cerrado sentido restrito, pastagem em uso e pastagem com arbóreas, por meio do programa STAMP utilizando o teste ANOVA Tukey-Kramer. O valor médio para cada grupo é demonstrado em forma de linha. Legenda: JCC ó cerrado chuva; JCS ó cerrado seca; JPUC- pastagem em uso chuva; JPUS ó pastagem em uso seca; JPAC ó pastagem com arbóreas chuva; JPAS ó pastagem com arbóreas seca. Números 1 a 3 representam as repetições das áreas.

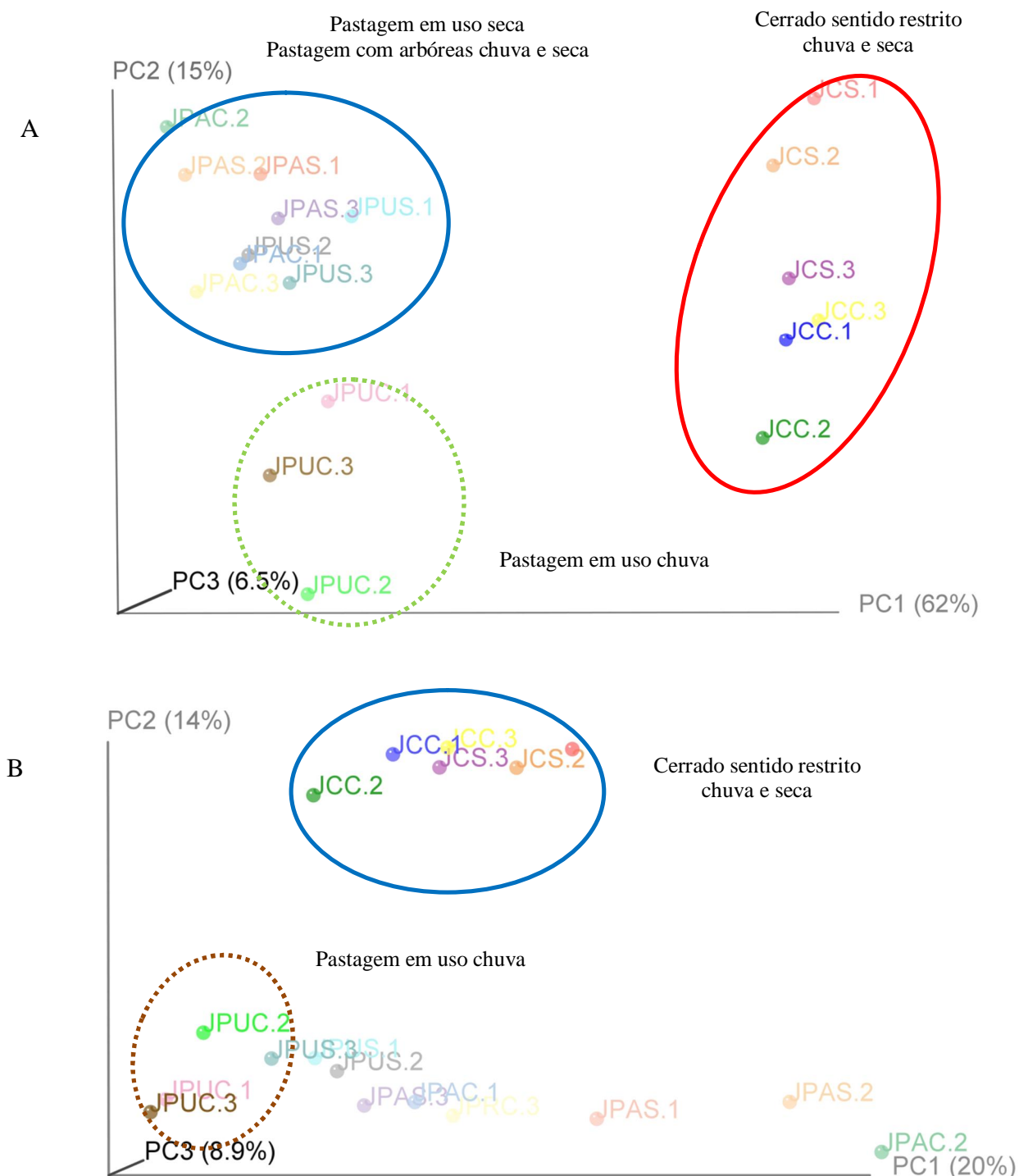


Figura 46. Análise de Coordenadas Principais (PCoA) *weighted* (A) e *unweighted* (B) das sequências 16S rDNA do solo de áreas de cerrado sentido restrito, pastagem em uso e pastagem com arbóreas obtidas por pirosequenciamento e analisadas através do programa Unifrac. (JCC 1 a 3: cerrado sentido restrito chuva; JCS 1 a 3: cerrado sentido restrito seca; JPUC 1 a 3: pastagem em uso chuva; JPUS 1 a 3: pastagem em uso seca; JPAC 1 a 3: pastagem com arbóreas chuva; JPAS 1 a 3: pastagem com arbóreas seca).

#### 4. Discussão

O conteúdo gravimétrico nas áreas analisadas diferiu significativamente, onde a área de cerrado sentido restrito apresentou os menores valores nas duas estações. Tal variação pode estar ligada ao fato de que as áreas de pastagem tanto em uso, quanto com plantio de arbóreas, tem gramínea como cobertura vegetal evitando perda de água.

A adição de nutrientes na pastagem em uso e na pastagem com plantio de arbóreas induziram as alterações nas características químicas das áreas, incluindo alterações no pH e na disponibilidade de elementos. Os valores de pH variaram entre as áreas, onde a área de cerrado apresentou menores valores por não ter recebido correção de calcário, como nas áreas de pastagem.

A área de pastagem com arbóreas apresentou os maiores valores para a concentração de P disponível. Esses valores podem ser resultado do acréscimo de nutrientes para o plantio das espécies arbóreas. Como as amostras foram coletadas próximas as covas (40 cm) podem ter influenciado nos valores mais altos. Fósforo é nutriente essencial para a comunidade microbiana. Variações em sua concentração podem induzir a alterações na comunidade de microrganismos. Os sistemas naturais, como florestas e campos nativos, conseguem auto-sustentar-se sem adição de fertilizantes fosfatados, mesmo em solos com baixa disponibilidade de fósforo (P). Nesses sistemas, o P disponível é controlado pela ciclagem de P orgânico (Po), tendo como componente essencial a biomassa microbiana (GUGGENBERGER *et al.*, 1996).

Os valores Ca disponível também foram maiores para as pastagens. A área de cerrado apresentou os menores valores para os nutrientes analisados, com exceção ao Al disponível, que foi mais alto. O valor encontrado é uma característica dos solos de Cerrado não detectada nas outras área em função da calagem recebida.

Tais alterações levaram à separação das áreas de cerrado sentido restrito das áreas de pastagem em uso e pastagem com arbóreas. A separação ocorreu tanto para a estação chuvosa quanto para a estação seca, observadas através da análise de componentes principais. Os fatores de diferenciação foram o elemento alumínio e a umidade do solo das amostras. A separação para as áreas de pastagem ocorreu somente na estação chuvosa, pois na estação seca, as pastagens em uso e com arbóreas se agruparam.

Nos solos das áreas analisadas, encontramos membros dos principais filos bacterianos (filos Acidobacteria, Proteobacteria, Actinobacteria e Bacteroidetes). Esses



quatro filos, de acordo com Bachar *et al.*(2010) estão presentes nos solos dos maiores biomas da Terra. A riqueza de filos de bactérias foi semelhante entre os solos dos tratamentos analisados, com variações somente na abundância. Foi observada uma variação entre as áreas e estações, com agrupamento diferenciado entre elas (Figura 40 A e B). A variação da diversidade microbiana ao longo das estações do ano ainda não é bem compreendida, já que em cada estação parece ocorrer uma comunidade microbiana dominante acompanhada de outras pouco abundantes que, muitas vezes, estão abaixo do nível de detecção dos métodos de avaliação (TORSVIK & ØVREÅS, 2002). Tais variações estão diretamente ligadas ao regime hídrico, à estrutura e ao manejo do solo, e ao teor e à qualidade dos resíduos vegetais aportados (TIEDJE *et al.*, 2001). Solos com teor elevado de matéria orgânica tendem a manter a população microbiana mais estável ao longo do ano, provavelmente, pela heterogeneidade das fontes de carbono (DE FEDE *et al.*, 2001).

O grupo de bactérias não classificadas apresentou maior abundância na área de cerrado sentido restrito em relação aos outros filos identificados para a área.

Em todos os tratamentos o filo Acidobacteria foi o mais abundante nas três áreas, com valores variando entre 20 e 40% das sequências de bactérias analisadas. As áreas de pastagem apresentaram os maiores valores, próximos a 40%. A área de pastagem com arbóreas apresentou os valores mais altos na estação chuvosa.

O filo Acidobacteria é agora reconhecido oficialmente pelo manual de Bacteriologia Sistemática (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) (GARRITY *et al.*, 2004) e inclui três gêneros com representantes cultiváveis: *Acidobacterium* (Aeróbico), *Geothrix* e *Holophaga* (Anaeróbicos restritos). Estes gêneros são abundantes em lagos de água doce, pântanos, solo e intestinos humanos. Os membros do filo Acidobacteria estão entre os mais abundantes do solo. Estudos mostram que mais de 30% do total de sequências obtidas em bibliotecas de clones de 16S rDNA de solos pertencem ao filo Acidobacteria (QUAISER *et al.*, 2003; YOUSSEF & ELSHAHED, 2009). Trabalhando com comunidades microbianas do solo de Mata Atlântica por meio da construção de bibliotecas de clones de 16S rDNA e sequenciadas pelo método de Sanger, Bruce *et al.* (2010) também foi encontrado o filo Acidobacteria como o mais abundante.

A amplitude de divergência entre as sequências do gene 16S rDNA gene no filo Acidobacteria é similar a encontrada no filo Proteobacteria, sugerindo com isto, uma grande diversidade metabólica. Entretanto, o potencial metabólico de Acidobacteria é pouco descrito e sua abundância sugere um maior impacto na ciclagem de nutrientes em solos

(HUGENHOLTZ *et al.*, 1998). Estudos têm sido realizados com o objetivo de verificar a capacidade do filo em utilizar diversas fontes de carbono, como polímeros de plantas, pois este está presente em solos com diferentes quantidades de carbono (EICHORST *et al.*, 2011).

Em 1997, Hedlund e colaboradores, propuseram o filo Verrucomicrobia que possui representantes amplamente distribuídos na natureza, principalmente no solo. Vários trabalhos relatam a presença deste filo em solos de floresta, cultivados e solos áridos, em diferentes lugares do mundo (HEDLUND 1997; DUNBAR 1999). Lindström *et al.* (2004) investigaram os fatores que afetam a composição de bacterioplâncton em diferentes profundidades, em um lago na Suécia com diferentes tratamentos de fósforo (P), e concluíram a alta disponibilidade desse composto favoreceu a população deste grupo. No entanto, neste trabalho foi observado que a quantidade de fósforo disponível nas pastagens foi significativamente maior que na área de cerrado, local que apresentou maior abundância do filo. Talvez seja possível inferir que a existência do filo possa ser favorecida pela temperatura do solo (SAIT *et al.*, 2006). A área de cerrado sentido restrito está sempre protegida pela vegetação mantendo assim uma temperatura mais estável em relação aos solos de pastagem, que possuem maior área sem densa cobertura de vegetação.

Entre os fatores responsáveis por condições mais favoráveis ao desenvolvimento microbiano, nas áreas sob vegetação natural, merecem destaque a ausência de preparo do solo (resultando em maior presença de raízes, as quais aumentam a entrada de substratos carbonados no sistema, via exudatos radiculares), a maior diversidade florística (MENDES *et al.*, 2002), quantidade e qualidade dos resíduos vegetais retornados ao solo proporcionando a ocorrência de menor variação e de níveis mais adequados de temperatura e umidade (OLIVEIRA *et al.*, 2001).

O filo Proteobacteria apresenta grande diversidade de morfologia celular e fisiologia. As estratégias para obtenção de energia são várias, incluindo organismos com metabolismos quimiolitotrófico, quimiorganotrófico e fototrófico, além de outras vias metabólicas especializadas em organismos adaptados a nichos diversos (CANHOS *et al.*, 1997). É um filo de grande importância para os ciclos do carbono, nitrogênio e enxofre. Apesar de o filo conter o maior número de isolados descritos do que outros filos, a maior parte ainda não foi cultivada (KERSTERS *et al.*, 2006).

Os filos Acidobacteria e Proteobacteria foram dominantes neste trabalho, com alta porcentagem de abundância nas áreas de pastagem em uso e pastagem com arbóreas. Smit *et al.*(2001) foram os primeiros a reconhecer a importância destes dois

filos e levantar a hipótese de que a razão Proteobacteria/Acidobacteria aumenta quando a disponibilidade de nutrientes também aumenta em solos agrícolas.

Em trabalho com o objetivo de verificar os efeitos da rotação de culturas e do plantio direto em comunidades bacterianas de solo, Yin *et al.* (2010) observaram que o filo Proteobacteria foi mais estável em abundância com as modificações ocorridas no solo do que o filo Acidobacteria. No presente estudo, ao contrário, verificamos uma diminuição do filo Proteobacteria na pastagem com arbóreas em relação à pastagem em uso. A pastagem com arbóreas recebeu acréscimo de nutrientes e revolvimento do solo para abertura das covas. O filo Acidobacteria, entretanto, aumentou na pastagem com arbóreas.

Um dado marcante encontrado neste trabalho é a grande abundância encontrada para o filo AD3 na área de cerrado sentido restrito. Este filo é identificado em proporções baixas, em torno de 2%, e normalmente encontradas em solo rizosférico, solos de tundra, solos com alto teor de umidade e solos de minas. Aparentemente, o pH baixo de solo ou a alta concentração de metais em solos de minas parecem ser responsáveis pela alta abundância deste filo (HUR *et al.*, 2011). Quando comparamos as áreas de cerrado sentido restrito e as áreas de pastagem, em uso e com arbóreas, tanto os valores de pH quanto de Al disponível no solo são maiores para a área de cerrado. Estes podem ser fatores de diferenciação entre as áreas. Isto pode ser observado na análise de componentes principais (PCA ó Figura 40 A e B), onde as áreas de cerrado sentido restrito se separaram das outras áreas, tanto na estação chuvosa quanto na seca, e entre os fatores de diferenciação estavam o Al disponível e o filo AD3.

Com relação aos filos menos abundantes, observou-se um aumento da abundância dos filos TM7, Armatimonadetes e TM6 nas áreas de pastagem em uso e com arbóreas em relação ao cerrado sentido restrito. A área de cerrado sentido restrito apresentou 1% de suas sequências referentes ao filo WPS-2 na estação seca. O filo WPS-2 raramente é detectado em solos, entretanto já foi identificado em solo próximos as rachaduras onde ocorre liberação de gases pelo vulcão Socompa, em Puna de Atacama, nos Andes (COSTELLO *et al.*, 2009). Entre os filos menos abundantes encontra-se o filo SPAM, em maior abundância nas áreas de pastagem. Este filo foi encontrado em solos próximos as geleiras Pindari (Himalaia) e apresentou habilidades de crescimento em baixas temperaturas (*psychrophiles*) e temperatura ideal em 15° C (SHIVAJI *et al.*, 2011). Mais estudos serão necessários para que se possa relacionar sua presença nos solos estudados.

D Rivière *et al* (2009) em trabalho realizado com microrganismos envolvidos na digestão de sedimentos observaram a presença dos filos TM6, TM7 e WPS-2 em menor abundância. A presença de animais nas áreas de pastagem e cobertura vegetal diferenciada poderia estar relacionada a estas diferenças. Sobre os filos TM6 e TM7 quase não existem informações, tendo sido encontrados em esponjas no mar Mediterrâneo (SCHMITT *et al.*, 2012).

O filo Aramatimonadetes ainda está sendo identificado, mas já foi isolado através de métodos independentes de cultivo de vários ambientes, como áreas de tratamento de águas residuais (aeróbicos e anaeróbicos), ambientes hipersalinos, em águas quentes e solo rizosférico (PORTILLO & GONZALEZ, 2009; LEE *et al.*, 2011; TAMAKI *et al.*, 2011). Características fenotípicas comuns de três estirpes cultivadas são Gram-negativas, aeróbicas, imóveis, produzem pigmento rosado, e capacidade para degradar polissacarídeos (TAMAKI *et al.*, 2011). Apesar de ter sido encontrado em menor abundância nas áreas estudadas, não existe relato deste filo em solos de cerrado.

O filo WPS -2 foi encontrado nos solos de cerrado sentido restrito e na pastagem em uso. Na área de pastagem em uso este foi considerado menos abundante. Este filo ainda está sendo estudado, portanto não se pode inferir ainda nenhuma atividade ou função. Trabalhos relatam a presença deste filo em solos poluídos (NOGALES *et al.*, 2001) e em sedimentos em profundidade (LIN *et al.*, 2012).

## 5. Conclusões

Através dos resultados obtidos foi possível concluir que:

Existem diferenças na comunidade bacteriana do solo das áreas amostradas em função à conversão do uso do solo para cultivo de pastagens e também com o plantio de espécies arbóreas na pastagem. A área de cerrado nativo apresentou um padrão diverso de distribuição dos filos.

Através das análises de nutrientes do solo foi possível verificar diferenças entre as áreas, onde as áreas de pastagem apresentaram maior concentração de nutrientes em relação a área de cerrado sentido restrito. Tais diferenças podem estar relacionadas à diferenciação das comunidades bacterianas. A partir das análises de pirosequenciamento dos fragmentos de 16S rDNA das amostras de DNA do solo com o objetivo de caracterizar a comunidade bacteriana foi possível observar a dominância do filo. Acidobacteria, Verrumicrobia, Proteobacteria e AD3. Nas áreas de pastagem em uso e pastagem com plantio de arbóreas, o filo Acidobacteria foi seguido pelos filos Firmicutes, Planctomycetes e Proteobacteria. O filo AD3 foi somente detectado na área de cerrado sentido restrito.

Quando analisamos a interação entre as áreas e o efeito da sazonalidade da precipitação podemos observar que este foi um fator marcante na diferenciação da estrutura das comunidades bacterianas. O aumento do teor de umidade no solo favoreceu os filos Acidobacteria e Planctomycetes nas áreas de cerrado sentido restrito e pastagem em uso. Na área de pastagem com plantio de espécies arbóreas houve, com a redução do teor de umidade no solo, o favorecimento do filo Planctomycetes.

## 6. Referências Bibliográficas

- BACHAR, A., AL-ASHHAB, A., SOARES, M.I.M., SKLARZ, M. Y., ANGEL, R., UNGAR, E. D., GILLOR, O. 2010. Soil microbial abundance and diversity along a low precipitation gradient. *Microbial Ecology* 60:453-461.
- BNDES 2009 . <http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/bndes> (em 02/06/2012).
- BOUYOUCOS, G. J. 1926. Rapid determination of the moisture content of soils. *Science* 64 [1670]:651-652.
- BRASIL Ministério do Meio Ambiente. Edital Probio 02/2004. Projeto executivo B.02.02.109. *Mapeamento de cobertura vegetal do bioma Cerrado: relatório final*. Brasília, DF, 93 p. Projeto concluído. Coordenador técnico: Edson Eyji Sano. Unidades executoras: Embrapa Cerrados, Universidade Federal de Uberlândia, Universidade Federal de Goiás. Disponível em: <http://mapas.mma.gov.br>.
- BROSSARD, M.; BARCELOS, A.O. 2005. Conversão do cerrado em pastagens cultivadas e funcionamento de latossolos. *Cadernos de Ciência e Tecnologia*, v.22, p.153-168.
- BRUCE, T; MARTINEZ, I; MAIA NETO, O; VICENTE, A.; KRÜGER, R.; THOMPSON, F. 2010. Bacterial community diversity in the Brazilian Atlantic Forest soils. *Microbial Ecology* 60 [4]: 840-849.
- CANHOS, V.P. 1997. Diversidade no domínio bactéria. In: Joly, C. A.; Bicudo, C. E. M. (orgs). *Biodiversidade do estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX*. 1 Microorganismos e Vírus. São Paulo: FAPESP, p.1-13.
- CAPORASO, J.G; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BIITINGER, K.; BUSHMAN, F.D.; COSTELLO, E.K.; FIERER, N.; PEÑA, A.G.; GOODRICH, J.K.; GORDON, J.I.; HUTTLEY, G.A.; KELLEY, S.T.; KNIGHTS, D.; KOENIG, J.E.; LEY, R.E.; LOZUPONE, C.A.; MCDONALD, D.; MUEGGE, B.D.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J.R.; TURNBAUGH, P.J.; WALTERS, W.A.; WIDMANN, J.; YATSUNENKO, T.; ZANEVELD, J.; KNIGHT, R. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 7 [5]:335-336.
- COSTELLO, E.K.; HALLOY, S.R.; REED, S. C.; SOWELL, P.; SCHIMIDT, S. K. 2009. Fumarole-supported islands of biodiversity within a hyperarid, high-elevation landscape on Socoma Volcano, Puna de Atacama, Andes. *Applied Environmental Microbiol.* 75: 7356-747.
- CRS/IBAMA. 2009. Relatório técnico de monitoramento do desmatamento no bioma Cerrado, 2002 a 2008: dados revisados. Acordo de cooperação técnica MMA/IBAMA/PNUD. 69p.
- DUNBAR, J.; TAKALA, S.; BARNS, S.M. 1999. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rDNA gene cloning. *Applied and Environmental Microbiology* 65 [4]: 1662-1669.
- EITEN, G. 1972. The cerrado vegetation of Brazil. *Botanical Review* 38: 201-341.
- EICHORST, S.A.; KUSKE, C.R.; SCHMID, T.M. 2011. Influence of plant polymers on the distribution and cultivation of bacteria in the phylum Acidobacteria. *Applied Environmental Microbiology* 77[2]: 586-596.
- EMBRAPA- Centro Nacional de Pesquisa de Solos 1997. Manual de métodos de análise de solo/ Centro Nacional de Pesquisa de Solos. 2. ed. ver. Atual- Rio de Janeiro, 212p.
- FAO ó <http://www.ric.fao.org/pr/comisiones/codegalac> 2008

- DE FEDE, K.L.; PANACCIONE, D.G.; SEXTONE, A.J. 2001. Characterization of dilution enrichment cultures obtained from size-fractionated soil bacteria by BIOLOGR community-level physiological profiles and restriction analysis of 16S rDNA genes. *Soil Biology and Biochemistry* 33 [11]: 1555-1562.
- FELFILI, J.M. 1994. Floristic composition and phytosociology of the gallery forest along side the Gama stream in Brasilia, DF, Brazil. *Revista Brasileira de Botânica* 17[1]: 1-11.
- GARRITY, G.M.; BELL, J.A.; LILBURN, T.G. 2004. Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd ed., release 5.0. Springer-Verlag, NY. doi:10.007/bergeysoutline200405.
- GUGGENBERGER, G.; HAUMAIER, L.; THOMAS, R.J. 1996. Assessing the organic phosphorus status of an oxisol under tropical pastures following native savanna using <sup>31</sup>P NMR spectroscopy. *Biology and Fertility of Soils* 23:332-339.
- HEDLUND, B.P.; GOSINK, J.; STALEY, J.T. 1997. Verrucomicrobia a new division of the Bacterial containing three new species of Prostheco bacter. *Antonie Van Leeuwenhoek* 72 [1]: 29-38.
- HUR, M.; KIM, Y.; SONG, H-R.; KIM, J.M.; CHOI, Y.I.; Yi, H. 2011. Effect of genetically modified poplars on soil microbial communities during the phytoremediation of waste mine tailings. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 761167619.
- HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, P.M.; PACE, N.R. 1998. Impact of cultureindependent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology* 180:476564774.
- KAMEL, Z.; KHALIL, S.; SHALABY, A.M. 1989. Calcium and biological activities of two Streptomyces species isolated, from the rhizosphere of soybean plants. *Journal of Basic Microbiology* 29 [1]: 31-39.
- KERSTERS, K.; DE VOS, P.; GILLIS, M.; SWINGS, J.; VANDAMME, P.; STACKEBRANDT, E. 2006. Introduction to the Proteobacteria. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (eds). *The Prokaryotes*, 3rd edn, vol. 5. Springer: New York, pp 3637.
- LAIRD, N.M.; WARE, J.H. 1982. Random-Effects Models for Longitudinal Data. *Biometrics* 38 [4]: 963-974.
- LAL, R. 2004. Soil carbon sequestration impacts on global climate change and food security. *Science* 304 [5677]: 1623-1627.
- LEE, K.C.Y.; DUNFIELD, P.F.; MORGAN, X.C.; CROWE, M.A.; HOUGHTON, K.M.; VYSSOTSKI, M., RYAN, J.L.J.; LAGUTIN, K.; MCDONALD, I.R.; STOTT, M.B. 2011. Chthonomonas calidirosea gen. nov., sp nov., an aerobic, pigmented, thermophilic micro-organism of a novel bacterial class, Chthonomonadetes classis nov., of the newly described phylum Armatimonadetes originally designated candidate division OP10. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 61:248262490.
- LI, W.; GODZIK, A. 2006. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 22: 165861659.
- LIN, X.; KENNEDY, D.; FREDRICKSON, J.; BJORNSTAD, B.; KONOPKA, A. 2012. Vertical stratification of subsurface microbial community composition across geological formations at the Hanford Site. *Environmental Microbiology* 14 [2]: 4146425.
- LINDSTRÖM, E.S.; VREDE, K.; LESKINEN, E. 2004. Response of a member of the Verrucomicrobia, among the dominating bacteria in a hypolimnion, to increased phosphorus availability. *Journal of Plankton Research*. 26 [2]: 241-246.

- MASCHIO, L.; GAIAD, S.; MONTOYA, L.; CURCIO, G.R.; RACHWALLI, M.F.G.; CAMARGO, C.M.S.; BATTI, A.M.B. 1992. Microrganismos e auto-sustentação de ecossistemas em solos alterados. In: *Simpósio Nacional sobre áreas degradadas*. Curitiba (PR), Anais. Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná. 440-445.
- MENDES, I.C.; REIS JÚNIOR, F.B. dos; PEREIRA NETO, J.V. 2002. Uso de indicadores biológicos e bioquímicos para avaliar a qualidade de solos de cerrado sob plantio direto e convencional. In: Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de plantas, Rio de Janeiro. FERTBIO2002: Agricultura: bases ecológicas para o desenvolvimento social e econômico sustentado. Rio de Janeiro- Não paginado.
- MENDONÇA, R.C; FELEFILI, J.M.; WALTER, B.M.T.; SILVA JR, M.C.; REZENDE, A.V; FILGUEIRAS, T.S.; NOGUEIRA, P.E.; FAGG, C.W. 2008. Flora vascular do Bioma Cerrado: checklist com 12.356 espécies. Sano SM, Almeida SP, Ribeiro JF. editores. *Cerrado: ecologia e flora*. Planaltina- DF: Embrapa Cerrados. v 2. 1279p.
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. 2002. *Microbiologia e bioquímica do solo*. UFLA Universidade Federal de Lavras, Lavras, p 626
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- MUYZER, G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 2: 317-322.
- MMA 1998. (Ministério do Meio Ambiente). Primeiro relatório nacional para a Conservação sobre Diversidade Biológica. Ministério do Meio Ambiente (MMA), Brasília, DF.
- NOGALES, B.; MOORE, E.R.B.; LLOBET-BROSSA, E.; ROSSELLO-MORA, R.; AMANN, R.; TIMMIS, K.N. 2001. Combined use of 16S ribosomal DNA and 16S rDNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil. *Applied and Environmental Microbiology* 67[4]: 1874-1884.
- OLIVEIRA, J.R.A.; MENDES, I.C.; VIVALDI, L. 2001. Carbono da biomassa microbiana em solos de cerrado sob vegetação nativa sob cultivo: avaliação dos métodos fumigação-incubação e fumigação-extração. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 25 [4]: 863-871.
- PANKHURST, C.E.; HAWKE, B.G.; MCDONALD, H.J.; KIRKBY, C.A.; BUCKERFIELD, J.C.; MICHELSEN, P.; O'BRIEN, K.A.; GRUPTA, V.V.S.R.; DOUBE, B.M. 1995. Evaluation of soil biological properties as potential bioindicators of soil health. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 35: 1015-1028.
- PARKS, D.H.; BEIKO, R.G. 2010. Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities. *Bioinformatics* 26: 7156721.
- PEREIRA, J.C.; NEVES, M.C.P.; DROZDOWICZ, A. 1999. Influência da antibiose exercida por actinomicetos às estirpes de *Bradyrhizobium* spp. na nodulação da soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34[1]: 99-108.
- PORTILLO, M.C.; GONZALEZ, J.M. 2009. Members of the candidate division OP10 are spread in a variety of environments. *World Journal Microbiology and Biotechnology* 25:3476353.
- QUAISER, A.; OCHSENREITER, T.; LANZ, C.; SCHUSTER, S C.; TREUSCH, A.H.; ECK, J. 2003. Acidobacteria form a coherent but highly diverse group



- within the bacterial domain: evidence from environmental genomics. *Molecular Microbiology* 50: 563-575.
- RIVIÈRE, D.; DESVIGNES, V.; PELLETIER, E.; CHAUSSONNERIE, S.; GUERMAZI, S.; WEISSENBAACH, J.; LIL, T.; CAMACHO, P.; SGHIR, A. 2009. Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. *ISME Journal* 3: 7006714.
- SAIT, M.; DAVIS, K.E.R.; JANSSEN, P. H. 2006. Effect of pH on isolation and distribution of members of subdivision 1 of the phylum Acidobacteria occurring in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 72 [3]: 185261857.
- SHIVAJI, S.; PRATIBHA, M.S.; SAILAJA, B.; HARA, K.; SINGH, A.K.; ,BEGUM, Z.; ANARASI, U.; PRABAGARAN, S.R.; ,REDDY, G.S.; SRINIVAS, T.N. 2011. Bacterial diversity of soil in the vicinity of Pindari glacier, Himalayan mountain ranges, India, using culturable bacteria and soil 16S rRNA gene clones. *Extremophiles* 15: 1-22.
- SILVA JÚNIOR, M.C. 2005. Fitossociologia e estrutura diamétrica na mata de galeria do córrego do Pitoco, na Reserva Ecológica do IBGE, DF. *Cerne Lavras* 11[2]: 147-158.
- SMIT, E.; LEEFLANG, P.; GOMMAS, S.; BROEK, J.; WERNERS, K. 2001. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology* 67 [5]: 2284 6 2291.
- SCHIMTT, S.; HENTSCHEL, U.; TAYLOR, M.W. 2012. Deep sequencing reveals diversity and community structure of complex microbiota in five Mediterranean sponges. *Hydrobiologia* 687 [1]: 341-351.
- TAMAKI, H.; TANAKA, Y.; MATSUZAWA, H.; MURAMATSU, M.; MENG, X.Y.; HANADA, S.; MORI, K.; KMAGATA, Y. 2011. *Armatimonas rosea* gen. nov., sp nov., of a novel bacterial phylum, *Armatimonadetes* phyl. nov., formally called the candidate phylum OP10. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 61:144261447.
- TIEDJE, J.M.; CHO, J.C.; MURRAY, A.; TREVES, D.; XIA, B.; AHO, J. 2001. Soil teeming with life: new frontiers for soil science. In: Rees R. M.; Ball, B. C.; Campbell, C. D.; Watson, C. A. (Org.). *Sustainable management of soil organic matter*. Wallingford: CAB International, 2001. p. 393-412.
- TORSVIK, V.; ØVREAAAS, L. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 5 [3]: 2406245.
- TURNER, D.P.; URBANSKI, S.; WOFSY, S.C.; BREMER, D.; GOWER, S.T.; GREGORY, M. 2003. A cross-biome comparison of light use efficiency for gross primary production. *Global Change Biology* 9:383 6 395.
- YIN ,C.; JONES, K.L.; PETERSON, D.E.; GARRETT, K.A.; HULBERT TIMOTHY, S.; PAULITZ, C. 2010. Members of soil bacterial communities sensitive to tillage and crop rotation. *Soil Biology and Biochemistry* 42 :2111-2118.
- YOUSSEF, N.H.; ELSHAHED, M.S. 2009. Diversity rankings among bacterial lineages in soil. *ISME Journal* 3: 3056313.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciaram a grande diversidade da comunidade bacteriana encontrada em solos de Cerrado. As variações encontradas estão relacionadas às mudanças de uso da terra. O acréscimo de nutrientes ao solo para cultivo, a entrada de espécies invasoras e a retirada da vegetação nativa para o estabelecimento de pastagens foram os agentes destas mudanças.

Quando comparamos as duas áreas de cerrado sentido restrito (Reserva Ecológica do IBGE e Paracatu) podemos verificar diferenças entre a abundância dos filos encontrados e a presença ou ausência de filos. A área de cerrado de Paracatu possui o filo SPAM, não detectado nos solos de cerrado sentido restrito da Reserva Ecológica do IBGE.

Através das análises dos resultados verificou-se o efeito da gramínea invasora *Melinis minutiflora* sobre a comunidade bacteriana do solo, mostrando mais um impacto da espécie sob o ambiente. As variações foram observadas nas duas estações estudadas, seca e chuvosa, bem como no experimento em vasos.

Importante ressaltar que o grupo de bactérias não classificadas foi representativo nas análises realizadas para as duas áreas amostradas. Tal resultado aponta a necessidade de mais estudos para a identificação de grupos taxonômicos desconhecidos na comunidade microbiana do solo.

Apesar de serem necessários mais estudos para o conhecimento da diversidade microbiana do solo, os dados aqui apresentados mostram os efeitos causados pelas mudanças do uso da terra no Cerrado e podem ser usados como ferramentas para o estabelecimento de práticas de manejo do solo e recuperação de áreas degradadas.