



**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-graduação em Ecologia**

**DIVERSIDADE EM COMUNIDADES BACTERIANAS DE SOLOS DE MATAS DE  
GALERIA DO CERRADO**

**Gabriela Teixeira Rodrigues Lira**

**Brasília – DF**  
**2012**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA

**DIVERSIDADE EM COMUNIDADES BACTERIANAS DE SOLOS DE MATAS DE  
GALERIA DO CERRADO**

GABRIELA TEIXEIRA RODRIGUES LIRA

Orientadora: Prof. Dr. Mercedes Maria da Cunha Bustamante

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Ecologia da Universidade de  
Brasília, como requisito parcial para  
a obtenção do título de Mestre em  
Ecologia.

Brasília - DF, 2012



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA

## AGRADECIMENTOS

Dissertação de Mestrado

**GABRIELA TEIXEIRA RODRIGUES**

Título:

**“Diversidade em comunidades bacterianas de solos de matas de galeria do Cerrado”.**

**Banca Examinadora:**

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

**Profa. Dra. Gabriela Bielefeld Nardoto**  
**Membro Titular**  
**FUP/UnB**

**Prof. Dr. Helson Mário Martins do Vale**  
**Membro Titular**  
**FIT/UnB**

**Prof. Dr. Fábio Bueno dos Reis Júnior**  
**Membro Suplente**  
**Embrapa**

Brasília, 23 de julho de 2012.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, pelo dom da perseverança e pelas bênçãos que recebo diariamente!

A toda minha amada família, em especial mamãe, papai, Mari e Leo, por todo apoio, torcida e paciência!

Ao André, meu amor, pela dedicação, compreensão e companheirismo, principalmente nos dias mais difíceis!

À Dra. Mercedes Bustamante, pelo empenho dedicado a este trabalho. Obrigada!

Ao Dr. Ricardo Krüger e ao Laboratório de Enzimologia, pela ajuda e apoio no desenvolvimento das análises moleculares.

À RECOR-IBGE, pela contribuição para realização dos trabalhos de campo.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado e, juntamente à FAPDF, PRONEX e PELD, pelo financiamento do projeto.

Aos Drs. Lúcio José Vivaldi, Frederico Takahashi e Sabrina do Couto de Miranda, pelo suporte e colaboração nas análises estatísticas.

Aos amigos do Programa de pós-graduação em Ecologia – UnB.

A todos os amigos do Laboratório de Ecologia de Ecosystemas, em especial Viviane Miranda, Simone Mitre, Jimmy Hernández, Danielle Teodoro, Carol Gonzalez, pela ajuda nas coletas e análises laboratoriais e pelos ótimos momentos de descontração!

A todos os amigos do Laboratório de Enzimologia, pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho e pelos momentos inesquecíveis de risadas e conversas produtivas!

Um agradecimento especial à Maria Regina Sartori da Silva, pela amizade, ajuda e incentivo! Muito obrigada!

A todos os meus amigos queridos! Especialmente às minhas companheiras de batalhas acadêmicas, Mary e Let, que sabem bem o significado da finalização desta etapa! E à Cela querida, que completa o quarteto imbatível de Sampa!

À amiga Sandry, que partiu precocemente e deixou muitas saudades! Sua alegria e bom humor nunca serão esquecidos!

## RESUMO

A microbiota presente no solo é fundamental para a manutenção de processos biogeoquímicos e sustentação das comunidades vegetais nos mais diversos biomas. A diversidade da comunidade microbiana de solos e os processos que regulam esta comunidade são ainda pouco conhecidos. No presente trabalho objetivou-se comparar a diversidade de bactérias presentes em solos de Matas de Galeria do Cerrado, considerando as variações temporais (sazonalidade da precipitação, simulação da entrada de nutrientes e água com os primeiros eventos de precipitação) e espaciais (gradiente topográfico) e distúrbios (incêndio acidental), por meio de análises moleculares utilizando a metodologia PCR-RISA de 16S-23S rDNA. Amostras de solo foram coletadas (0-10 cm) nas porções seca e úmida do gradiente topográfico das Matas de Galeria dos Córregos Pitoco, Monjolo e Taquara (RECOR, IBGE, Brasília – DF), nas estações seca e chuvosa e nas transições estacionais (2010 - 2011), e após incêndio acidental (setembro/2011). Em geral, o teor de umidade do solo diferiu entre porções úmida e seca da topografia e seguiu as variações de precipitação registradas ao longo do estudo. A sazonalidade e o gradiente topográfico também influenciaram as concentrações de nutrientes no solo, porém sem um padrão definido. Valores de pH e CTC e concentrações de MO, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, P, K e Ca foram mais elevadas no período pós-fogo em uma ou mais matas. Os dendrogramas com os perfis de RISA das comunidades bacterianas indicaram alteração na diversidade de bactérias do solo em função da passagem do fogo, da sazonalidade da precipitação e ao longo do gradiente topográfico das três matas. Modificações nos perfis de diversidade bacteriana podem estar relacionadas às interações entre alterações químicas e de umidade registradas no solo e às diferentes comunidades florísticas encontradas ao longo do gradiente topográfico de cada mata. Com o sequenciamento de bandas escolhidas nos géis de RISA verificou-se predominância das divisões actinobactéria e proteobactéria nos perfis das comunidade bacterianas. Com a finalidade de simular o efeito da primeira chuva (5 mm) após estação seca sobre a diversidade bacteriana do solo de matas de galeria, adicionou-se experimentalmente água, N e P ao solo da comunidade úmida da mata do córrego Pitoco. As parcelas demarcadas receberam tratamentos distintos (água; água + N; água + P; água + N + P) e as coletas de solo foram realizadas antes da aplicação dos tratamentos e uma hora, 24

horas e 48 horas após adição. Avaliação de alterações na diversidade bacteriana do solo em resposta à aplicação dos tratamentos também foi realizada através de PCR-RISA 16S-23S rDNA. Umidade do solo, pH e concentração de P disponível não sofreram alteração após aplicação dos tratamentos. Concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  aumentaram em até três vezes após adição de água e nutrientes, independente do tratamento aplicado. Concentrações de  $\text{N-NH}_4^+$  aumentaram uma hora depois da adição de água + N e 24 horas depois da adição de água + N + P. A comunidade bacteriana apresentou resposta imediata à entrada de água e nutrientes no solo apresentando alteração nos perfis de diversidade uma hora após aplicação dos tratamentos. O ápice da resposta bacteriana à entrada de água no solo foi observado 24 horas depois e na primeira hora após aplicação dos tratamentos foi observado maior efeito da adição de nutrientes ao solo. A comunidade bacteriana do solo, portanto, responde prontamente à entrada de água e nutrientes no início da estação chuvosa havendo clara modificação no perfil de diversidade durante a transição entre estações.

**Palavras-chave:** savanas, florestas ripárias, sazonalidade da precipitação, gradiente topográfico, fogo, diversidade bacteriana, RISA.

## ABSTRACT

The soil microbiota is essential for the maintenance of biogeochemical processes and plant communities in diverse biomes. The diversity of soil microbial community and the processes that regulate this community are still poorly known. The present study aimed to compare the diversity of bacteria present in soils of the Cerrado gallery forests, considering the temporal variations (seasonality of precipitation, simulation of water and nutrient inputs with the first rain events) and spatial variations (topographic gradient) and disturbances (accidental fire), using molecular analysis (PCR-RISA of 16S rDNA). Soil samples were collected (0-10 cm) from dry and wet portions of the topographic gradient of the gallery forests of Pitoco, Monjolo and Taquara streams (RECOR, IBGE, Brasilia - Brazil), during the dry and wet seasons and the seasonal transitions (2010 - 2011), and after an accidental fire (September/2011). In general, the soil moisture content differed between wet and dry portions of the topographic gradient and followed the variations of precipitation recorded during the study period. The seasonality and topographic gradient also influenced the concentrations of nutrients in the soil, but without a well-defined pattern. Values of soil pH and CEC, and concentrations of organic matter,  $\text{N-NO}_3^-$ ,  $\text{N-NH}_4^+$ , P, K and Ca were higher in the post-fire in one or more forests. The dendrograms with RISA profiles of bacterial communities showed changes in the diversity of soil bacteria due to the fire, the seasonality of precipitation and along the topographic gradient of the three forests. Changes in bacterial diversity profiles were likely a response to the interactions between physical and chemical changes recorded in the soil and the different floristic communities found along the topographic gradient of each forest. The sequencing of selected bands in RISA gels indicated the predominance of Actinobacteria and Proteobacteria divisions in the community profiles. In order to simulate the effect of the first rain events (5 mm) after the dry season on the soil bacterial diversity of the gallery forests, water, N and P were experimentally added to the soil of wet portion of Pitoco stream gallery forest. The experimental plots received different treatments (water, water + N, water + P, water + N + P) and soil samples were collected before treatment application and one hour, 24 hours and 48 hours after addition. Evaluation of changes in soil bacterial

diversity in response to application of treatments was also performed using PCR-RISA of 16S-23S rDNA. Soil moisture, pH and available P concentration did not change after treatment application. Concentrations of  $\text{N-NO}_3^-$  increased by three times after addition of water and nutrients, regardless of the treatment. Concentrations of  $\text{N-NH}_4^+$  enhanced one hour after the addition of water + N and 24 hours after addition of water + N + P. The bacterial community showed immediate response to water and nutrients input to the soil showing changes in the diversity profiles one hour after treatment application. The peak response of the bacterial community to the input of water to soil was observed 24 hours later and the effect on the bacterial diversity by the addition of nutrients was better observed in the first hour after treatment application. Therefore, the soil bacterial community is responsive to the input of water and nutrients at the beginning of the wet season and there is a clear shift in the diversity profile during the transition between seasons.

**Keywords:** savannas, stream forests, seasonality, topographic gradient, fire, microbial diversity, RISA

## Lista de figuras

**Figura 1.** Diagrama de perfil (1) e cobertura arbórea (2) de uma Mata de Galeria Inundável (A) e de uma Mata de Galeria Não-Inundável (B), representando, cada figura, uma faixa de 80 m de comprimento por 10 m de largura. Figura adaptada de Ribeiro & Walter (1998).

**Figura 2.** Dados pluviométricos (mm) da Reserva Ecológica do IBGE no período de estudo, entre setembro de 2010 e setembro de 2011. A seta indica período em que ocorreu a queimada acidental na RECOR.

**Figura 3.** Localização da Reserva Ecológica do IBGE (RECOR) no Distrito Federal e Sub-Bacia do Córrego Taquara indicando as áreas de estudo que se localizam nas matas de galeria dos córregos Pitoco, Monjolo e Taquara dentro da RECOR. Fontes: Imagem GeoEye/Google Earth (2012) e [www.recor.org.br/cerrado/hidrografia](http://www.recor.org.br/cerrado/hidrografia).

**Figura 4.** Fotos das matas de galeria dos córregos Pitoco, Monjolo e Taquara na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília - DF.

**Figura 5.** Ilustração indicando a divisão de uma mata de galeria em comunidades úmida, intermediária e seca.

**Figura 6.** Desenho esquemático da disposição dos transectos e parcelas nas comunidades úmida e seca das matas de galeria do Pitoco, Monjolo e Taquara, RECOR, Brasília - DF.

**Figura 7.** Desenho esquemático da disposição das parcelas e subparcelas empregadas no experimento instalado na comunidade úmida da mata de galeria do Pitoco, RECOR, Brasília, DF, durante o período de 28 a 30 de setembro de 2010. Dentro de cada parcela, as subparcelas receberam tratamentos diferenciados: adição de água destilada; adição de água + amônio; adição de água + fosfato; e adição de água + amônio + fosfato.

**Figura 8.** Gel de agarose 1%. Extração de DNA.

**Figura 9.** Géis de agarose 1%. Produtos de amplificação de amostras de solo coletadas nas matas do Pitoco, Monjolo e Taquara durante estação seca e estação chuvosa.

**Figura 10.** Valores médios do teor de umidade (%) e pH em água e em CaCl<sub>2</sub> das amostras de solo (0-10 cm de profundidade) coletadas nas comunidades úmida e seca da mata de galeria do córrego Pitoco nas estações seca e chuvosa e transição entre elas (agosto/2010 a maio/2011) e após queimada ocorrida em setembro/2011.

**Figura 11.** Valores médios de MO ( $\text{dag.kg}^{-1}$ ), CTC ( $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$ ), P ( $\text{mg}.\text{dm}^{-3}$ ), K ( $\text{mg}.\text{dm}^{-3}$ ),  $\text{N-NO}_3^-$  ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ),  $\text{N-NH}_4^+$  ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ), Ca ( $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$ ), Mg ( $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$ ) e Al ( $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$ ) no solo (0-10 cm de profundidade) das comunidades úmida e seca da mata de galeria do córrego Pitoco, nas estações seca e chuvosa, e após queimada ocorrida em setembro/2011.

**Figura 12.** Dendrograma (UPGMA) dos perfis das comunidades bacterianas presentes nos solos da mata de galeria do Pitoco, em duas posições do gradiente topográfico (comunidade seca e comunidade úmida) e em diferentes períodos da sazonalidade de precipitação (estação seca e estação chuvosa), utilizando o coeficiente de similaridade de DICE.

**Figura 13.** Dendrograma (UPGMA) dos perfis das comunidades bacterianas presentes nos solos da mata de galeria do Pitoco, em duas posições do gradiente topográfico (comunidade seca e comunidade úmida) e nas transições entre estação seca e estação chuvosa e entre estação chuvosa e estação seca, utilizando o coeficiente de similaridade de DICE.

**Figura 14.** Dendrograma ilustrando a relação de similaridade (UPGMA com coeficiente de DICE) entre perfis das comunidades bacterianas presentes em solos da mata de galeria do Pitoco em duas posições do gradiente topográfico (comunidade seca e comunidade úmida) uma semana após queimada acidental ocorrida em setembro de 2011.

**Figura 15.** Dendrograma ilustrando a relação de similaridade (UPGMA com coeficiente de DICE) entre perfis das comunidades bacterianas presentes em solos da mata de galeria do Pitoco em duas posições do gradiente topográfico (comunidade seca e comunidade úmida) e na transição entre estações seca e chuvosa de 2010 e de 2011, sendo que no segundo ano as coletas de solo foram realizadas uma semana após queimada acidental ocorrida na mata.

**Figura 16.** Valores médios do teor de umidade (%) e pH em água e em  $\text{CaCl}_2$  das amostras de solo (0-10 cm de profundidade) coletadas nas comunidades úmida e seca da mata de galeria do córrego Monjolo nas estações seca e chuvosa e transição entre elas (agosto/2010 a maio/2011) e após queimada ocorrida em setembro/2011.

**Figura 17.** Valores médios de MO ( $\text{dag.kg}^{-1}$ ), CTC ( $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$ ), P ( $\text{mg}.\text{dm}^{-3}$ ), K ( $\text{mg}.\text{dm}^{-3}$ ),  $\text{N-NO}_3^-$  ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ),  $\text{N-NH}_4^+$  ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ), Ca ( $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$ ), Mg ( $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$ ) e Al ( $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$ ) no solo (0-10 cm de profundidade) das comunidades úmida e seca da mata de galeria do córrego Monjolo, nas estações seca e chuvosa, e após queimada ocorrida em setembro/2011.

**Figura 18.** Dendrograma (UPGMA) dos perfis das comunidades bacterianas presentes nos solos da mata de galeria do Monjolo, em diferentes posições do gradiente topográfico (comunidade seca e comunidade úmida) e em diferentes períodos da sazonalidade de precipitação (estação seca e estação chuvosa), utilizando o coeficiente de similaridade de DICE.

**Figura 19.** Dendrograma (UPGMA) dos perfis das comunidades bacterianas presentes nos solos da mata de galeria do Monjolo, em diferentes posições do gradiente topográfico (comunidade seca e comunidade úmida) e nas transições entre estação seca e estação chuvosa e entre estação chuvosa e estação seca, utilizando o coeficiente de similaridade de DICE.

**Figura 20.** Dendrograma ilustrando a relação de similaridade (UPGMA com coeficiente de DICE) entre perfis das comunidades bacterianas presentes em solos da mata de galeria do Monjolo em duas posições do gradiente topográfico (comunidade seca e comunidade úmida) e em quatro períodos diferentes da sazonalidade de precipitações (estação seca, estação chuvosa, transição entre estações seca e chuvosa e transição entre estações chuvosa e seca).

**Figura 21.** Dendrograma ilustrando a relação de similaridade (UPGMA com coeficiente de DICE) entre perfis das comunidades bacterianas presentes em solos da mata de galeria do Monjolo em duas posições do gradiente topográfico (comunidade seca e comunidade úmida) uma semana após queimada acidental ocorrida em setembro de 2011.

**Figura 22.** Dendrograma ilustrando a relação de similaridade (UPGMA com coeficiente de DICE) entre perfis das comunidades bacterianas presentes em solos da mata de galeria do Monjolo em duas posições do gradiente topográfico (comunidade seca e comunidade úmida) e na transição entre estações seca e chuvosa de 2010 e de 2011, sendo que no segundo ano as coletas de solo foram realizadas uma semana após queimada acidental ocorrida na mata.

**Figura 23.** Valores médios do teor de umidade (%) e pH em água e em  $\text{CaCl}_2$  das amostras de solo coletadas de 0 a 10 cm de profundidade nas comunidades úmida e seca da mata de galeria do córrego Taquara nas estações seca e chuvosa e transição entre elas (agosto/2010 a maio/2011) e após queimada ocorrida em setembro/2011.

**Figura 24.** Valores médios de MO ( $\text{dag.kg}^{-1}$ ), CTC ( $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$ ), P ( $\text{mg}.\text{dm}^{-3}$ ), K ( $\text{mg}.\text{dm}^{-3}$ ),  $\text{N-NO}_3^-$  ( $\text{mg}.\text{kg}^{-1}$ ),  $\text{N-NH}_4^+$  ( $\text{mg}.\text{kg}^{-1}$ ), Ca ( $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$ ), Mg ( $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$ ) e Al ( $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$ ) no

solo (0-10 cm de profundidade) das comunidades úmida e seca da mata de galeria do córrego Taquara nas estações seca e chuvosa, e após queimada ocorrida em setembro/2011.

**Figura 25.** Dendrograma (UPGMA) dos perfis das comunidades bacterianas presentes nos solos da mata de galeria do Taquara, em diferentes posições do gradiente topográfico (comunidade seca e comunidade úmida) e em diferentes períodos da sazonalidade de precipitação (estação seca e estação chuvosa), utilizando o coeficiente de similaridade de DICE.

**Figura 26.** Dendrograma (UPGMA) dos perfis das comunidades bacterianas presentes nos solos da mata de galeria do Taquara, em diferentes posições do gradiente topográfico (comunidade seca e comunidade úmida) e nas transições entre estação seca e estação chuvosa e entre estação chuvosa e estação seca, utilizando o coeficiente de similaridade de DICE.

**Figura 27.** Dendrograma ilustrando a relação de similaridade (UPGMA com coeficiente de DICE) entre perfis das comunidades bacterianas presentes em solos da mata de galeria do Taquara em duas posições do gradiente topográfico (comunidade seca e comunidade úmida) e em quatro períodos diferentes da sazonalidade de precipitações (estação seca, estação chuvosa, transição entre estações seca e chuvosa e transição entre estações chuvosa e seca).

**Figura 28.** Dendrograma ilustrando a relação de similaridade (UPGMA com coeficiente de DICE) entre perfis das comunidades bacterianas presentes em solos da mata de galeria do Taquara em duas posições do gradiente topográfico (comunidade seca e comunidade úmida) uma semana após queimada acidental ocorrida em setembro de 2011.

**Figura 29.** Dendrograma ilustrando a relação de similaridade (UPGMA com coeficiente de DICE) entre perfis das comunidades bacterianas presentes em solos da mata de galeria do Taquara em duas posições do gradiente topográfico (comunidade seca e comunidade úmida) e na transição entre estações seca e chuvosa de 2010 e de 2011, sendo que no segundo ano as coletas de solo foram realizadas uma semana após queimada acidental ocorrida na mata.

**Figura 30.** RISA das amostras de solo coletadas na mata do Taquara nas estações seca e chuvosa.

**Figura 31.** RISA das amostras de solo coletadas nas Matas do Pitoco e do Taquara após queimada ocorrida em setembro/2011.

**Figura 32.** RISA das amostras de solo coletadas na Mata do Monjolo após queimada ocorrida em setembro/2011.

**Figura 33.** Géis de agarose 1%. Extração de DNA. Amostras coletadas antes da adição de água e nutrientes e amostras coletadas uma hora após adição de água e nutrientes.

**Figura 34.** Géis de agarose 1%. Produtos de amplificação por PCR com primers L1R e 1406F de amostras de solo coletadas no experimento desenvolvido na porção úmida da mata do Pitoco.

**Figura 35.** Umidade (%), pH em água e em  $\text{CaCl}_2$  e concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ),  $\text{N-NH}_4^+$  ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) e P disponível ( $\text{mg.dm}^{-3}$ ) no solo das subparcelas estabelecidas na comunidade úmida da mata do Pitoco, antes da adição (tempo 0) e 1 hora, 24 horas e 48 horas após adição de água; água +  $\text{NH}_4^+$ ; água +  $\text{PO}_4^-$ ; e água +  $\text{NH}_4^+$  +  $\text{PO}_4^-$ .

**Figura 36.** Dendrograma com relação de similaridade (UPGMA com coeficiente de DICE) entre perfis das comunidades bacterianas presentes no solo das subparcelas do experimento estabelecido na comunidade úmida da mata do Pitoco antes e após uma hora da adição de água no solo.

**Figura 37.** Dendrograma com relação de similaridade (UPGMA com coeficiente de DICE) entre perfis das comunidades bacterianas presentes no solo das subparcelas do experimento estabelecido na comunidade úmida da mata do Pitoco antes e após 24 horas da adição de água

**Figura 38.** Dendrograma com relação de similaridade (UPGMA com coeficiente de DICE) entre perfis das comunidades bacterianas presentes no solo das subparcelas do experimento estabelecido na comunidade úmida da mata do Pitoco antes e após 48 horas da adição de água no solo.

**Figura 39.** Dendrograma com relação de similaridade (UPGMA com coeficiente de DICE) entre perfis das comunidades bacterianas presentes no solo das subparcelas do experimento estabelecido na comunidade úmida da mata do Pitoco antes e após uma hora, 24 horas e 48 horas da adição de água no solo.

## Lista de tabelas

**Tabela 1.** Localização, características edáficas, largura e topografia das matas de galeria dos córregos Pitoco, Monjolo e Taquara, RECOR, Brasília-DF.

**Tabela 2.** Médias das porcentagens de argila e silte no solo das comunidades úmida e seca das matas do Pitoco, Monjolo e Taquara (Silva Júnior, 1995).

**Tabela 3.** Datas de coletas de amostras compostas de solo nas matas do Pitoco, Monjolo e Taquara da Reserva Ecológica do IBGE.

**Tabela 4.** Variações estatisticamente significativas de parâmetros do solo das matas do Pitoco, Monjolo e Taquara em função da sazonalidade da precipitação, gradiente topográfico e período pós-fogo.

**Tabela 5.** Justificativa da escolha da banda, sequenciamento das bandas retiradas dos géis de RISA 16S-23S das matas de galeria do Pitoco, Monjolo e Taquara, identidade com banco de dados BLAST, e-value e número de acesso no GenBank do organismo de maior identidade com a sequência.

**Tabela 6.** Análise de solos (0-10 cm de profundidade) das comunidades vegetais úmidas e secas das matas do Pitoco, Monjolo e Taquara, RECOR, Brasília - DF, nas estações seca e chuvosa e após queimada acidental em setembro de 2011.

## SUMÁRIO

Resumo .....	iii
Abstract.....	v
Lista de figuras .....	viii
Lista de tabelas .....	xiii
<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1 Matas de galeria do Cerrado .....	1
1.2 Comunidades microbianas do solo .....	4
1.3 Sazonalidade da precipitação, heterogeneidade espacial e comunidades microbianas do solo.....	7
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>12</b>
<b>3. Hipóteses.....</b>	<b>12</b>
<b>4. Áreas de estudo .....</b>	<b>13</b>
<b>5. Desenho experimental .....</b>	<b>20</b>
5.1 Variações sazonais e espaciais da diversidade bacteriana do solo .....	20
5.2 Efeito de curto prazo da adição de água, nitrogênio e fósforo sobre as comunidades bacterianas do solo.....	22
<b>6. Coletas e análises laboratoriais .....</b>	<b>24</b>
6.1. Determinação do teor de umidade do solo.....	24
6.2. Determinação do pH .....	25
6.3. Determinação das concentrações de N-nítrico (N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) e N-amoniacal (N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ).....	25
6.4. Extração de DNA das amostras de solo.....	25
6.5. Análise dos perfis das comunidades bacterianas .....	26
6.6. Sequenciamento de fragmentos de DNA.....	26
6.7. Análise dos resultados .....	27
<b>7. Resultados .....</b>	<b>28</b>
<b>7.1 Variações sazonais e espaciais da diversidade bacteriana do solo e efeito do fogo sobre comunidades bacterianas .....</b>	<b>28</b>
7.1.1 Extração de DNA e PCR.....	28
7.1.2 Perfis das comunidades bacterianas (RISA) e variáveis de solo.....	29

7.1.3 Sequenciamento .....	65
<b>7.2 Efeito de curto prazo da adição de água, nitrogênio e fósforo sobre as comunidades bacterianas do solo</b> .....	<b>70</b>
7.2.1 Extração de DNA e PCR.....	70
7.2.2 Variáveis de solo .....	72
7.2.3 Perfis das comunidades bacterianas .....	74
<b>8. Discussão</b> .....	<b>80</b>
8.1. Efeito da sazonalidade da precipitação .....	81
8.1.1 Transições entre estações .....	84
8.2. Efeito do gradiente topográfico .....	88
8.3. Efeito do incêndio acidental .....	93
8.4. Sequenciamento .....	95
<b>9. Conclusões</b> .....	<b>98</b>
<b>10. Referências Bibliográficas</b> .....	<b>102</b>
Anexo 1 .....	120
Anexo 2 .....	122

# **1. Introdução**

## **1.1 Matas de galeria do Cerrado**

A vegetação que ocorre ao longo de cursos d'água, tais como ribeirão, córrego, rio ou lago, é conhecida como vegetação ripária ou zona ripária. Essa vegetação reflete a interação dos componentes florísticos com os processos geomorfológicos fluviais que propiciam o suporte ecológico para o seu desenvolvimento (Lima & Zakia, 2005). Ecossistemas ripários desempenham papel crítico na regulação das interações entre componentes terrestres e aquáticos, tanto em regiões de clima temperado (Gregory et al, 1991; Gilliam, 1994; Lawrence et al, 1997; Naiman & Decamps, 1997) como em florestas de clima tropical (Bowden et al, 1992; McDowell et al, 1992, 1996; McClain et al, 1994; Brandes et al, 1996; Williams et al, 19997; Chestnut & McDowell, 2000), e está presente nos mais diversos biomas, como no Cerrado brasileiro.

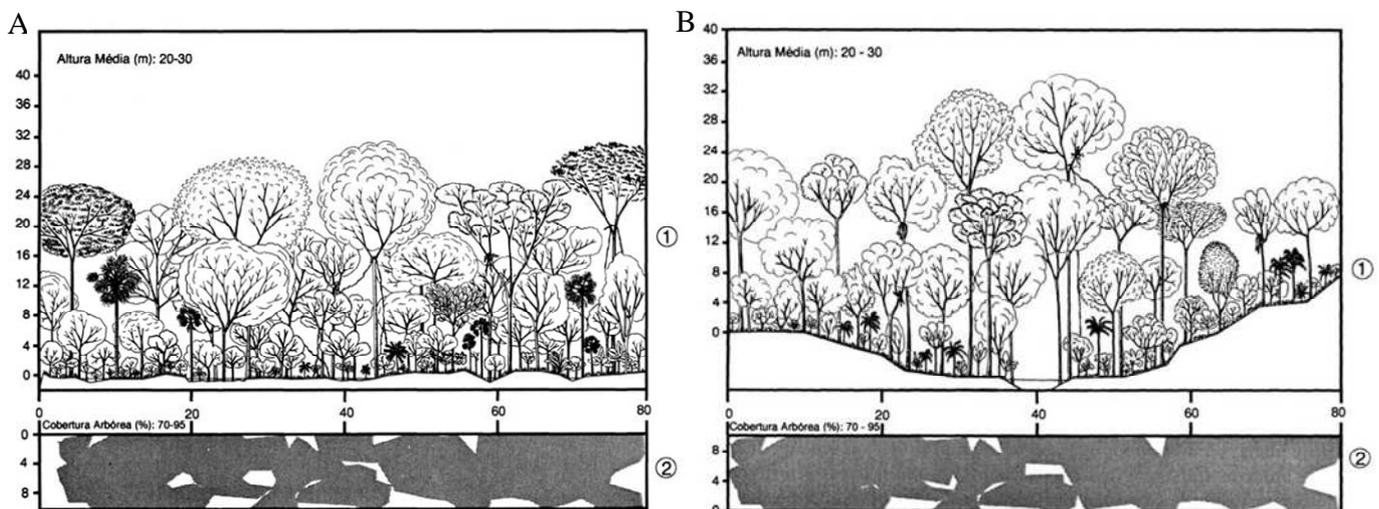
O Cerrado é o segundo maior bioma do Brasil, ocupando cerca de 24% do território nacional, sendo superado em área apenas pela Amazônia. O termo cerrado é comumente utilizado para designar o conjunto de ecossistemas (savanas, matas, campos e matas de galeria) que ocorrem no Brasil Central (Eiten, 1972) e que são denominados fitofisionomias. O clima dessa região é estacional, onde um período chuvoso, que dura de outubro a março e no qual se concentra 90% das chuvas, é seguido por um período seco, de abril a setembro. A precipitação média anual é de 1.500 mm e as temperaturas são geralmente amenas ao longo do ano, entre 22 e 27 °C.

A vegetação do bioma Cerrado apresenta fisionomias (formas de vegetação) que englobam formações florestais, savânicas e campestres. Por fisionomia, entende-se a estrutura, as formas de crescimento (árvores, arbustos, etc.) e as mudanças estacionais (sempre verde, semi-decídua, etc.) predominantes na vegetação. Em sentido fisionômico, “floresta” representa áreas com predominância de espécies arbóreas, onde há formação de dossel contínuo ou, em alguns casos, descontínuo (Ribeiro & Walter, 2008).

Segundo Ribeiro & Walter (2008), a flora do Cerrado é característica e diferenciada pelos biomas adjacentes, embora muitas fisionomias compartilhem espécies com outros

biomas. Dessa forma, são vários os fatores que determinam a distribuição da flora e a formação diferenciada de fitofisionomias, podendo serem citados o clima, química e física do solo, disponibilidade de água e nutrientes, geomorfologia e topografia, latitude, frequência de queimadas, profundidade do lençol freático, pastejo e inúmeros fatores antrópicos, como abertura de áreas para atividades agropecuárias, retirada seletiva de madeira, queimadas como manejo de pastagens, dentre outros.

No Cerrado, pequenos rios e córregos são circundados e acompanhados por formações florestais fechadas sobre os cursos d'água denominadas Matas de Galeria que representam apenas 5% do bioma. Essas, por sua vez, são geralmente circundadas por outras fitofisionomias com padrões vegetativos distintos, como Campo Limpo e Cerrado Típico. A altura média do estrato arbóreo em Matas de Galeria varia entre 20 e 30 m, apresentando uma superposição das copas que fornecem cobertura arbórea de 70% a 95%, mantendo a umidade relativa em seu interior sempre mais alta que nas outras fitofisionomias, inclusive na época mais seca do ano (Ribeiro & Walter, 1998) (Figura 1). Os solos das Matas de Galeria são geralmente Cambissolos, Plintossolos, Argissolos, Gleissolos ou Neossolos, podendo ainda ocorrer Latossolos mais férteis e ácidos que os das áreas de Cerrado (Ribeiro & Walter, 2008).



**Figura 1.** Diagrama de perfil (1) e cobertura arbórea (2) de uma Mata de Galeria Inundável (A) e de uma Mata de Galeria Não-Inundável (B), representando, cada figura, uma faixa de 80 m de comprimento por 10 m de largura. Figura adaptada de Ribeiro & Walter (1998).

De acordo com características ambientais como topografia e variações periódicas na altura do lençol freático, a Mata de Galeria pode ser separada em dois subtipos: Mata de Galeria Não-Inundável, onde o lençol freático é mais profundo e não se eleva mesmo na estação chuvosa, e Mata de Galeria Inundável, cujo lençol freático se mantém próximo ou sobre a superfície durante a maior parte do ano. Apesar dessas designações, é comum a existência de locais em que a Mata apresenta não somente um desses padrões ao longo de todo o curso d'água, mas, ao invés disso, são encontrados trechos inundáveis em uma Mata que, no geral, se classifica como Não-Inundável e vice-versa (Ribeiro & Walter, 1998).

Mesmo sendo pouco representativas em termos de área do bioma Cerrado, as Matas de Galeria destacam-se pela diversidade genética e riqueza de espécies, que está na faixa de 230 espécies arbóreas por hectare (Rezende, 1998; Felfili *et al.* 2002). Mesmo próximas umas das outras, as matas apresentam composições florísticas bastante diferenciadas, pois as variações são mais dependentes de características microambientais dentro da mata do que da distância geográfica entre elas. As diferenças entre áreas úmidas em matas distintas muitas vezes são menores que aquelas encontradas entre áreas úmidas e bem drenadas em uma mesma mata, característica influenciada principalmente pela heterogeneidade edáfica e topográfica das matas (Silva Júnior, 1995; Felfili, 1997, Sampaio *et al.* 2000, Silva-Júnior, 2001).

Adicionalmente, as matas de galeria são especialmente importantes devido às funções ecológicas que desempenham, como repositórios de biodiversidade, refúgio para espécies florestais que não sobreviveriam no ambiente de cerrado, corredor de dispersão para espécies animais e proteção da fauna nativa, estabilização de margens de cursos d'água, proteção de nascentes e controle de erosão do solo, funcionando ainda como zonas tampão e filtro de sedimentos, substâncias químicas e nutrientes. Portanto, elas exercem forte influência sobre ecossistemas aquáticos e terrestres, o que lhes confere papel destacado na estruturação das paisagens (Lowrence *et al.*, 1984; Gregory *et al.*, 1991; Johnson *et al.*, 1999).

Por tudo isso, as Matas de Galeria estão protegidas pelo Código Florestal, art.2º da Lei 4.771/1965 que descreve como áreas de preservação permanente – APP – as florestas e demais formas de vegetação nativa existentes ao redor de rios, nascentes, lagos, lagoas e reservatórios, especificando a dimensão mínima de 30 m da faixa de vegetação a ser preservada. Mais

recentemente, a Lei nº 1.876/1999 veio modificar o art. 2º do Código Florestal, determinando redução de 30 para 15 m na faixa de proteção da vegetação que margeia cursos d'água de até 10 m de largura.

Os impactos ambientais causados pelo descumprimento da lei e pela destruição das Matas de Galeria (UNESCO, 2004) e o pouco conhecimento que se tem de processos ecológicos nela existentes, têm atraído interesse crescente de pesquisadores das mais diversas áreas, desde botânica e ecologia, até edafologia e pedologia. Entre os aspectos relacionados aos solos de ocorrência em Matas de Galeria, a maior parte dos trabalhos já realizados concentra-se na classificação desses solos e na caracterização de suas propriedades químicas e físicas. Existe, dessa forma, uma carência de estudos sobre os microrganismos que habitam os solos de Matas de Galeria (Mendes & Vivaldi, 2001) bem como sobre características ambientais que possam influenciar a dinâmica das comunidades microbianas do solo.

## **1.2 Comunidades microbianas do solo**

Em ecossistemas naturais, as entradas anuais de nutrientes via fontes atmosféricas e intemperização de rochas são limitadas, sendo a maioria dos nutrientes derivada da decomposição de resíduos orgânicos (Begon *et al.*, 2007). A microbiota do solo desempenha papel importante em diversos ciclos biogeoquímicos, influenciando a vegetação sobre o solo ao contribuir para a nutrição e integridade da planta e para estrutura e fertilidade do solo (Srivastava & Singh, 1991; Chen, 1998; Huang & Bollag, 1998). Comunidades de microrganismos heterotróficos que habitam o solo são mediadoras de processos chave no controle ecossistêmico dos ciclos do carbono e do nitrogênio, apresentando grande potencial na mediação entre diversidade de espécies vegetais e funcionalidade do ecossistema (Zak *et al.*, 2003).

Grande parte das bactérias e fungos do solo utilizam os resíduos vegetais e animais como fonte de carbono e energia. Nos processos de mineralização, formas orgânicas de nitrogênio, fósforo e enxofre na serapilheira são processadas pela ação microbiana e as formas inorgânicas resultantes tornam-se disponíveis para absorção pelas plantas. Somado a isso, as enzimas liberadas por esses microrganismos no solo participam das reações metabólicas

extracelulares que também resultam na decomposição de resíduos orgânicos, ciclagem de nutrientes, formação da matéria orgânica e da estrutura do solo (Mendes & Vivaldi, 2001).

Apesar dos microrganismos representarem cerca de 60% a 80% da fração viva e mais ativa da matéria orgânica do solo (Theng *et al.*, 1989), apenas recentemente, com o advento da biologia molecular, estudos vêm sendo desenvolvidos com o intuito de determinar o tamanho e diversidade populacional da microbiota presente em ambientes edáficos (Pereira *et al.*, 2006). Essas estimativas são de especial interesse, pois o solo é conhecido por abrigar as mais diversas populações microbianas de todos os ecossistemas do planeta (Roesch *et al.*, 2007) e abriga muitas espécies ainda desconhecidas (Douhan & Rizzo, 2005).

O termo biodiversidade tem sido definido de várias formas. Em termos microbianos, descreve o número de diferentes espécies e sua relativa abundância em uma dada comunidade em um habitat. Em termos ecológico-moleculares, ele pode ser definido como o número e forma de distribuição de diferentes tipos de seqüências presentes no DNA extraído da comunidade de um habitat específico (Garbeva *et al.* 2004). Apesar de refletir o potencial genético total da comunidade microbiana, a diversidade genética também pode refletir mudanças nas condições ambientais quando relacionada com crescimento seletivo e processos de sucessão (Johnsen *et al.*, 2001).

Com base em estudos moleculares, foi estimado que em uma tonelada de solo podem conter  $4 \times 10^6$  taxa diferentes de procariontes (Curtis *et al.*, 2002). Mesmo havendo divergências em relação ao número exato, há um consenso sobre a imensa magnitude do reino procariótico encontrado em solos.

Técnicas de cultivo da microbiologia convencional detectam de 1 a 10% dos microrganismos presentes no solo em função da alta seletividade dos meios de crescimento e pela interdependência de diferentes organismos entre si, dentre outros fatores (Nannipieri *et al.*, 2003). A contagem direta por microscopia de fluorescência pode resultar em 100 a 1000 vezes mais números de microrganismos obtidos quando comparada com o plaqueamento (Johnsen *et al.*, 2001). Porém, estas técnicas não fornecem uma visão acurada da diversidade dos membros da comunidade microbiana (Hunt *et al.*, 2004).

Durante as últimas duas décadas, uma grande variedade de ferramentas moleculares tem sido desenvolvida e vem ganhando uma relevância considerável na área de ecologia

molecular. Novas técnicas moleculares baseadas na caracterização de ácidos nucleicos extraídos do solo oferecem grande potencial para investigar a vasta porção da comunidade microbiana não cultivável (Crecchio et al., 2004). Elas são independentes de cultura e, de acordo com sua sensibilidade, podem detectar espécies, gêneros, famílias ou mesmo grupos taxonômicos maiores (Nannipieri et al., 2003). Um exemplo é a técnica de amplificação por PCR (Polimerase Chain Reaction) do gene 16S, que facilitou a investigação da diversidade bacteriana por análises genéticas independentes de cultivo prévio (Enkerli & Widmer, 2010).

Dentre outras técnicas moleculares estão ainda a análise do polimorfismo existente na região entre genes 16S e 23S rDNA ou Ribosomal Inter Space Analysis (RISA) e o uso de cromossomos bacterianos artificiais (BAC) para estudo metagenômico (Borneman & Triplett, 1997, Nannipieri *et al.*, 2003, Kirk *et al.*, 2004). Genes que codificam rDNA não variam muito em relação a seu tamanho, contém em sua seqüência regiões conservadas e variáveis e são moléculas convenientes, uma vez que a síntese de ribossomos tem sido fortemente conservada ao longo da evolução (Kennedy & Clipson, 2003).

No entanto, mesmo com avanços na área da ecologia molecular, trabalhos que examinaram populações de microrganismos específicas do solo de biomas brasileiros ainda são escassos. Manfio & Goodfellow (1995) e Linhares (1995) descreveram, respectivamente, populações de *Streptomyces* e actinomicetos das florestas úmidas da Amazônia. Esses estudos utilizaram técnicas de isolamento baseadas em cultura de células, que foram capazes de isolar apenas 1% da comunidade microbiana total do solo. Por meio de técnicas moleculares como RISA e seqüenciamento de clones de rDNA extraídos do solo sem a necessidade de cultivo prévio, Borneman & Triplett (1997) encontraram uma grande diversidade de microrganismos no solo da Floresta Amazônica, sendo que 98% dos clones eram de origem bacteriana e muitos deles advindos de espécies nunca antes relatadas.

Para o Cerrado, já foi visto que a sazonalidade bem marcada da precipitação característica desse bioma ocasiona mudanças nas comunidades microbianas do solo (Viana *et al.*, 2011; Silva, 2004; Bresolin, 2006; Bresolin *et al.*, 2010) em função dos efeitos sobre as características químicas do solo, que gera efeitos diretos sobre os microrganismos e sobre o funcionamento da comunidade vegetal. Outros estudos desenvolvidos no Brasil suportam ainda a hipótese de que a vegetação, além do clima, é determinante na composição da

microbiota do solo nos mais diferentes ecossistemas (Pereira *et al.*, 2006; Castro *et al.*, 2008; Quirino *et al.*, 2009; Bresolin *et al.*, 2010).

Segundo Mendes & Vivaldi (2001), o componente biológico apresenta estreita inter-relação com os componentes químicos e físicos do solo. Por isso, todos os fatores que afetam negativamente os microrganismos, promovendo perdas de matéria orgânica, também provocam deterioração das propriedades físicas e químicas dos ambientes edáficos. Esses impactos assumem importância ainda maior nos solos sob vegetação nativa onde a matéria orgânica é a principal fonte de nutrientes para o crescimento das plantas.

Portanto, entender mecanismos capazes de controlar a estrutura de comunidades e populações da microbiota do solo pode resultar em implicações importantes, como conservação da biodiversidade, manejo de comunidades de microrganismos para biorremediação, controle biológico de doenças radiculares e contribuição para o aumento da fertilidade do solo (Zhou *et al.*, 2002). A caracterização das comunidades do solo é de extrema importância ao fornecer dados para estudos posteriores sobre as populações bacterianas de solos em diferentes condições no Brasil (Pereira *et al.*, 2006), assim como ser somado aos dados de base para preservação de áreas nativas e recuperação de habitats degradados (Quirino *et al.*, 2009).

### **1.3 Sazonalidade da precipitação, heterogeneidade espacial e comunidades microbianas do solo**

A diversidade de comunidades microbianas é distribuída de forma heterogênea ao longo de ecossistemas (Araujo *et al.*, 2012). A diversidade, abundância e atividade dos microrganismos dependem essencialmente de fatores ambientais fundamentais como temperatura e umidade (Waksman *et al.*, 1928). No entanto, mais importante que valores absolutos desses fatores são as variações encontradas tanto espacialmente como temporalmente. A tolerância de grupos taxonômicos à variação nas condições ambientais é essencial na determinação da estrutura e funcionamento de comunidades (Krasheviska *et al.*, 2012).

Fatores climáticos, como sazonalidade da precipitação, direcionam processos ecossistêmicos por modificarem a disponibilidade de água e a ciclagem de nutrientes. A variação da disponibilidade natural de água no ambiente tem consequências significativas para o estoque de carbono no solo (Austin *et al.*, 2004), para produção primária e decomposição da matéria orgânica (Krasheviska *et al.*, 2012), e para os padrões de atividade biológica (Belnap *et al.*, 2004, 2005; Loik *et al.*, 2004). A sazonalidade da precipitação já foi apontada como um fator direcionador da perda de biomassa na serapilheira em pastagens, florestas temperadas e florestas tropicais, principalmente pela modificação da estrutura e atividade da comunidade microbiana (Swift *et al.*, 1979; Austin & Vitousek, 2000; Epstein *et al.*, 2002; Lensing & Wise, 2007; Bachar *et al.*, 2010).

As comunidades microbianas, como componentes fundamentais do ecossistema, apresentam papel crítico no metabolismo da matéria orgânica e nas transformações biogeoquímicas dos elementos, como observado na fixação de N<sub>2</sub> (Atlas & Bartha, 1998; Madigan *et al.*, 2000). A microbiota do solo é a principal responsável pela decomposição dos resíduos orgânicos, pela ciclagem de nutrientes e pelo fluxo de energia entre o solo e o ambiente circundante, exercendo influência tanto na transformação da matéria orgânica, como na estocagem do carbono e nutrientes minerais (Jenkinson & Ladd, 1981).

Em ecossistemas méxicos, assim como em ambientes áridos e semiáridos, a atividade da microbiota é altamente sincronizada com as entradas de água no solo (Huxman *et al.*, 2004, Collins *et al.*, 2008; Austin, 2011). Respostas rápidas da comunidade microbiana do solo à entrada de água normalmente resultam em aumentos quase instantâneos de mineralização de C e N (Degens & Sparling, 1995), seguidos por mudanças na razão C:N disponível na comunidade microbiana do substrato, que leva a uma compensação no balanço entre imobilização do nutriente e sua mineralização (Appel, 1998; Austin *et al.*, 2004).

No Cerrado, a sazonalidade natural da precipitação também é vista como um fator importante em processos ecossistêmicos que ocorrem no bioma (Butler *et al.*, 2004). Essa sazonalidade apresenta efeito direto sobre a composição, biomassa e atividade de microrganismos do solo de matas de galeria, que apresentam respostas bem distintas na estação seca e na estação chuvosa (Mendes & Vivaldi, 2001; Mendes *et al.*, 2012). Particularmente, a influência da transição entre estações seca e chuvosa sobre processos que

ocorrem no solo já foi estudada em áreas de pastagem e cerrado, através de adição artificial de água. Esses estudos mostraram que a entrada de água no solo resulta em alterações a curto prazo nos fluxos de C e N e em aumento na biomassa microbiana e na diversidade em comunidades bacterianas, principalmente nas primeiras 24 horas após a entrada de água (Pinto *et al.*, 2002, Varella *et al.*, 2004, Pinto *et al.*, 2006). Em matas de galeria não há registros de estudos desse tipo e, apesar de serem poucos os trabalhos sobre diversidade microbiana nessa fitofisionomia (Araujo *et al.*, 2012), a sazonalidade já foi vista como importante direcionadora de mudanças na biomassa e atividade microbiana no solo (Mendes & Vivaldi, 2001; Mendes *et al.*, 2012).

Além do fator climático, características edáficas e topográficas também podem influenciar a dinâmica da microbiota do solo. Comunidades microbianas são sensíveis a mudanças no conteúdo de água do solo, tanto temporalmente como espacialmente, e são capazes de responderem rapidamente a alterações no seu teor de umidade (Krashevskaya *et al.*, 2012), influenciando processos ecossistêmicos como decomposição da serapilheira e ciclagem de nutrientes (Stark & Firestone, 1995; Bamforth, 2007).

As propriedades físicas e químicas de solos de matas de galeria diferem de solos de outras fitofisionomias do Cerrado em decorrência do regime hidrológico e da topografia do substrato (Silva Júnior, 1995; Haridasan, 1998). Nas áreas próximas a corpos d'água, solos hidromórficos sazonalmente inundáveis (Gleissolos) com altas concentrações de matéria orgânica são frequentemente presentes (Reatto *et al.*, 2008) em oposição a solos lateríticos bem aerados (Latosolos) encontrados nos campos e savanas do Cerrado (Neufeldt, 2006).

Matas de galeria apresentam um gradiente topográfico ao longo do qual há grande variação do teor de umidade do solo (Silva Júnior, 1995; Silva Júnior, 2001). A literatura científica enfocada na relação entre vegetação e aspectos da topografia em matas de galeria tem apontado um tipo de gradiente topográfico que se direciona de fora para dentro da mata (borda da mata de galeria → meio → margem do córrego), como previamente identificado por Silva Júnior (1995). Esse gradiente caracteriza-se por apresentar terrenos mais elevados na porção borda, onde frequentemente há uma interface com outras fisionomias e, por outro lado, terrenos mais baixos na porção margem, mais próxima ao curso de água.

O gradiente topográfico entre a borda da mata e a margem do córrego pode ocasionar uma significativa variação na profundidade do lençol freático, levando-o a uma maior superficialidade na margem e maior profundidade na borda, influenciando o nível de saturação hídrica do solo de maneira distinta nas diferentes porções da mata. Como consequência, efeitos sobre a composição florística e estrutura da vegetação presente ao longo do gradiente topográfico são observados em decorrência das diferentes tolerâncias hídricas e carências nutricionais apresentadas pelas espécies (Silva-Júnior, 2001; Botrel *et al.*, 2002, Pinto *et al.*, 2005).

### **1.5 Fogo no Cerrado: efeitos sobre comunidades microbianas do solo**

Além de características climáticas e edáficas, distúrbios de frequências variadas, como queimadas, também tem papel relevante na composição e distribuição de espécies, tanto da flora e da fauna, como da microbiota. O fogo pode provocar uma série de modificações de natureza física, química e biológica no solo, principalmente por influenciar os ciclos biogeoquímicos e a estruturação das paisagens. Alteração do pH, aumento da fonte de carbono e oxidação da matéria orgânica são algumas consequências da passagem do fogo (Deka & Mishra, 1983; Santos *et al.*, 1992), que pode alterar ainda a umidade do solo em razão de mudanças nas taxas de infiltração e de transpiração, na porosidade e na resistência do solo à água (Lloyd, 1972; Sharrow & Wright, 1977; Mallik *et al.*, 1984; Hernani *et al.*, 1987; Meirelles, 1990; Santos *et al.*, 1992; Leite, 1996).

Em curto prazo, o fogo altera diretamente a composição e a atividade de comunidades microbianas ao selecionar as espécies mais tolerantes a altas temperaturas (DeBano *et al.*, 1998 *apud* Neary *et al.*, 1999). Bactérias costumam ser mais resistentes ao calor que fungos, tendendo a apresentar maior abundância relativa imediatamente após queimadas de intensidade moderada (Pietikäinen & Fritze, 1995). No entanto, o fogo apresenta-se como um fator de grande importância ao acelerar a remineralização da biomassa e a transferência dos nutrientes nela existente para a superfície do solo sob a forma de cinzas. Essa rápida disponibilização, às raízes e à microbiota, de nutrientes que estavam imobilizados na palha

seca e morta (Ramos & Rosa, 1996; Coutinho, 2002) pode ser um fator importante para uma rápida recuperação da comunidade microbiana após eventos de queimada.

O fogo tem um papel importante na história evolutiva de florestas tropicais. No Cerrado, ele é um fenômeno natural que ocorre no início da estação chuvosa, sendo um importante fator ecológico há milhares de anos, já que a ocorrência de queimadas no bioma vem sendo relatada desde 32.000 anos antes do presente (Salgado-Laboriau & Ferraz-Viantini, 1994). Com a ocupação do bioma pelo homem, a utilização do fogo como ferramenta no uso da terra modificou o regime de queima, que atualmente ocorre com mais frequência no auge da estação seca (Frost & Robertson, 1987). Nesse período, incêndios acidentais e severos ocorrem com frequência e se espalham com facilidade pela presença abundante de combustível seco. No entanto, devido à distribuição espacial heterogênea da severidade do fogo, solos naturalmente queimados aparecem como mosaico caótico de áreas pouco afetadas sendo alternadas com outras seriamente impactadas pelo fogo (Rab, 1996).

Em decorrência da ação antrópica, o fogo tem alcançado ambientes com menor probabilidade de queima, como florestas tropicais e equatoriais (Crutzen & Goldammer, 1993). No caso das matas de galeria, a aproximação da urbanização e a utilização de áreas adjacentes às matas para plantio e criação de gado têm acarretado em sérios danos a essa vegetação ribeirinha, que sofre com queimadas descontroladas. Nessas florestas o fogo normalmente extingue-se em sua borda (Felfili, 1995) e sua propagação para o interior da mata é desfavorecida pelo microclima mais úmido formado pela floresta. No entanto, em situações de seca extrema, queimadas muito intensas são capazes de ultrapassar as bordas dessas matas, atingindo seu interior (Felfili, 1997).

Apesar de serem poucos os estudos sobre a adaptação de matas de galeria a queimadas, sabe-se que a existência desse tipo de distúrbio nas bordas da mata permite a coexistência de espécies tolerantes ao fogo e espécies sensíveis a ele, no interior da mata, contribuindo para uma maior diversidade de espécies vegetativas dentro de florestas ripárias (Kellman & Meave, 1997; Kellman *et al.*, 1998). No entanto, matas de galeria não estão sujeitas aos mesmos níveis de estresse hídrico e frequência de queimadas observadas nos campos e savanas do bioma (Felfili, 1995) e, por isso, pouco se sabe sobre a influência desses eventos sobre processos ecológicos e comunidades microbianas que deles participam.

## **2. Objetivos**

Comparar a diversidade de bactérias presentes em solos de matas de galeria do Cerrado, considerando as variações temporais (sazonalidade da precipitação, entrada de nutrientes) e espaciais (gradiente topográfico) e distúrbios (incêndio acidental), por meio de análises moleculares utilizando a metodologia PCR-RISA.

I - A variação temporal será avaliada:

a) comparando-se amostras de solo coletadas nas estações seca e chuvosa e transições entre estações;

b) simulando a primeira chuva após estação seca, por meio do estabelecimento de experimento com adição de água e nutrientes no solo de uma mata de galeria, e comparando-se amostras de solo coletadas antes e em diferentes tempos amostrais após a adição de água e nutrientes;

c) comparando amostras de solo coletadas após incêndio acidental, que atingiu todas as áreas amostrais, ocorrido em setembro de 2011 (época de transição entre estações seca e chuvosa) com amostras coletadas em época correspondente no ano anterior ao incêndio.

II - A variação espacial será avaliada:

a) comparando-se amostras de solo coletadas em diferentes porções do gradiente topográfico das matas, seguindo a divisão em duas comunidades de acordo com a composição florística: seca e úmida (Silva Júnior, 1995);

b) comparando-se amostras de solo coletadas após o incêndio acidental nas três matas e seguindo a divisão em duas comunidades de acordo com a composição florística: seca e úmida (Silva Júnior, 1995).

## **3. Hipóteses**

Quanto ao efeito da sazonalidade e da simulação da primeira chuva após estação seca:

**H1:** As comunidades bacterianas apresentam diferentes perfis de diversidade em função da sazonalidade de precipitação.

**H2:** O perfil de diversidade bacteriana se diferencia após adição de água e nutrientes no solo.

**H3:** A alteração do perfil de diversidade bacteriana é mais pronunciada uma hora a um dia após adição de água e nutrientes no solo, voltando a padrões iniciais (de antes da adição) depois desse período.

**H4:** O perfil de diversidade bacteriana nas parcelas onde houve apenas adição de água é distinto do encontrado nas parcelas que receberam água e nutrientes.

Quanto ao efeito da topografia das matas de galeria:

**H5:** Os perfis de diversidade bacteriana se diferenciam ao longo do gradiente topográfico, sendo essa diferença mais acentuada na estação seca, época na qual o teor de umidade do solo apresenta maior variação ao longo do gradiente topográfico.

Quanto ao efeito do incêndio acidental:

**H6:** O fogo, ao promover diminuição da matéria orgânica e um aumento transiente do pH e da disponibilidade de nutrientes em zonas ripárias (Certini, 2005), resulta em modificações no perfil das comunidades bacterianas do solo de matas de galeria.

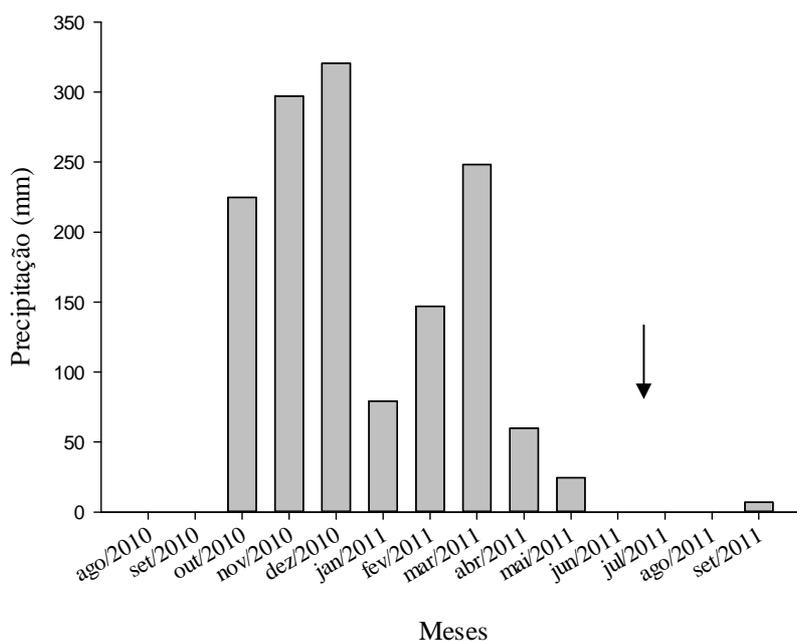
#### **4. Áreas de estudo**

As áreas de estudo encontram-se na Reserva Ecológica do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (RECOR / IBGE), localizada a 35 km ao sul do centro de Brasília, DF, 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 é classificado como Aw (classificação de Köppen), ou seja, é tropical, com duas estações bem definidas: seca e chuvosa. A precipitação anual média está

entre 1100 a 1600 mm e a estação seca normalmente ocorre entre os meses de junho e setembro.

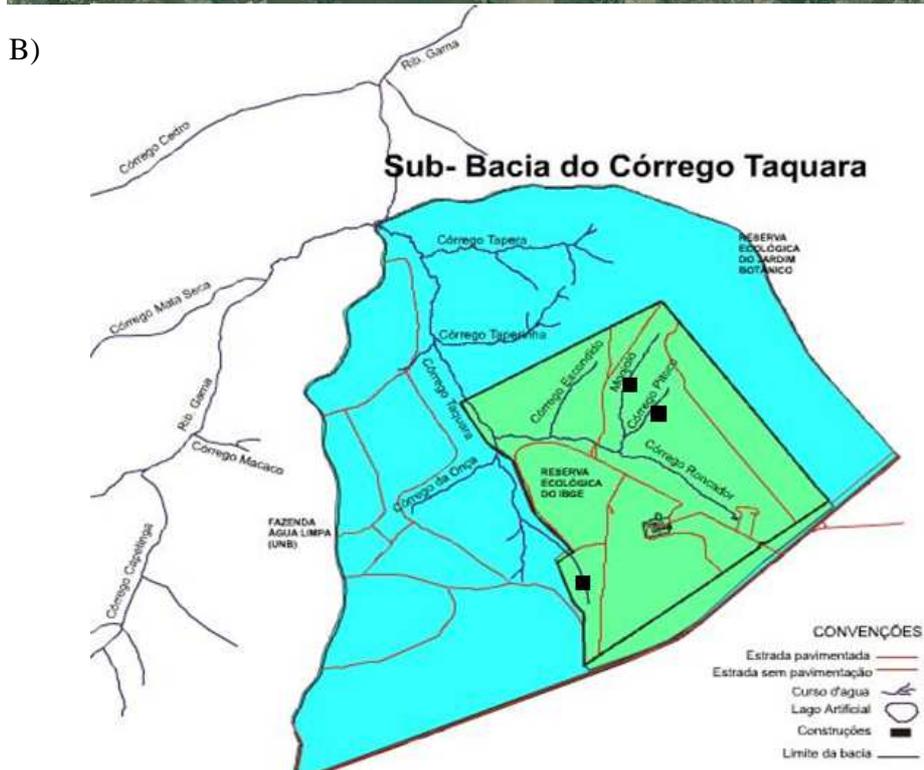
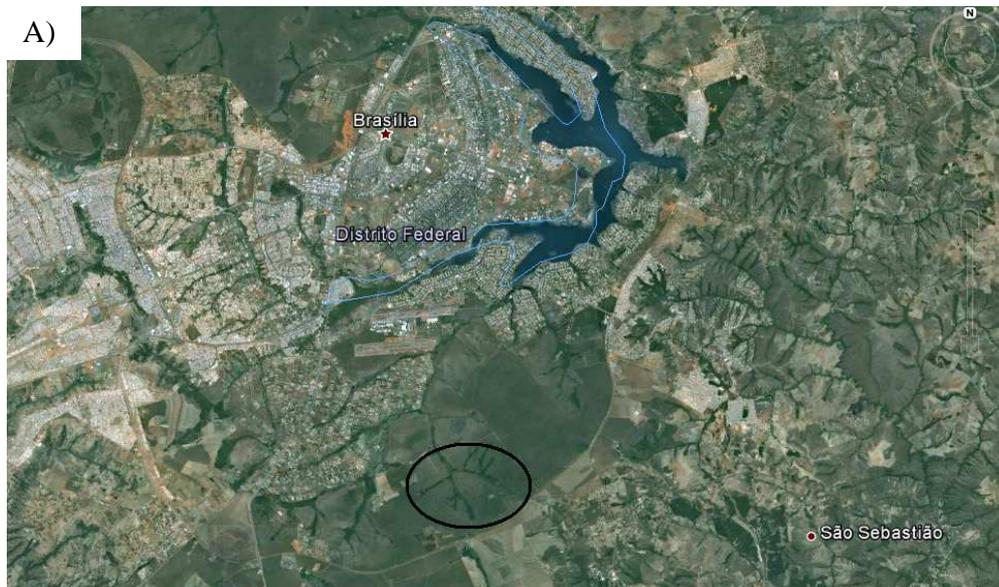
A precipitação na RECOR durante o período de estudo é apresentado na Figura 2. No período a que se refere o presente estudo (setembro de 2010 a setembro de 2011), o mês de maior volume de precipitação foi dezembro de 2010 (321 mm) e os mais secos foram setembro de 2010 e junho, julho e agosto de 2011, meses nos quais não houve registro de precipitação.

Em setembro de 2011 (final da estação seca), ocorreu um incêndio acidental que atingiu uma parte significativa da RECOR, afetando inclusive todo o perímetro das áreas amostrais do presente estudo. Na figura 2, a seta indica o mês em que ocorreu a queimada.



**Figura 2.** Dados pluviométricos (mm) da Reserva Ecológica do IBGE no período de estudo, entre setembro de 2010 e setembro de 2011. A seta indica período em que ocorreu a queimada acidental na RECOR.

Na RECOR, encontram-se cinco córregos denominados Taquara, Roncador, Escondido, Pitoco e Monjolo, que sustentam 104 ha de Matas de Galeria. Os três últimos são tributários do córrego Roncador, que desemboca no Córrego Taquara e que, por sua vez, corre para fora da Reserva até alcançar o Córrego do Gama, um dos formadores do Lago Paranoá (Figura 3). As três matas utilizadas neste estudo foram as dos córregos Pitoco, Monjolo e Taquara, tendo sido selecionadas porções não inundáveis dessas matas para o estabelecimento das áreas amostrais.



**Figura 3.** Localização da Reserva Ecológica do IBGE (RECOR) no Distrito Federal ( ○ ) (A) e Sub-Bacia do Córrego Taquara (B) indicando as áreas de estudo ( ■ que se localizam nas matas de galeria

dos córregos Pitoco, Monjolo e Taquara dentro da RECOR. Fontes:  
Imagem GeoEye/Google Earth (2012) e  
[www.recor.org.br/cerrado/hidrografia](http://www.recor.org.br/cerrado/hidrografia).

A mata do Pitoco ocorre na porção nordeste da reserva, sobre Latossolo Vermelho na maior parte de sua área (Figura 3-B). A mata é mais larga na cabeceira (160 m), onde o córrego forma uma cascata, tornando-se mais estreita (120 m) na foz, com manchas espalhadas de solos encharcados mais abaixo. A topografia é moderadamente inclinada (Silva Júnior, 2001) (Figura 4-A).



**Figura 4.** Fotos das matas de galeria dos córregos Pitoco (A), Monjolo (B) e Taquara (C) na Reserva Ecológica do IBGE, Brasília - DF.

A mata do Monjolo localiza-se ao lado da mata do Pitoco (Figura 3-B). Ambos correm na direção sul, encontrando-se antes de se juntarem ao córrego do Roncador. A mata possui 120 a 160 m de largura ao longo de sua extensão. O leito do córrego é bem definido, não apresentando áreas encharcadas. O solo predominante é o Latossolo Vermelho, com algumas manchas de Latossolo Vermelho-Amarelo com afloramentos de plintita. A topografia é plana na cabeceira e tende a ficar mais inclinada a jusante (Figura 4-B).

A mata do Taquara está localizada na porção sudeste da Reserva (Figura 3-B). Sua cabeceira é caracterizada pela presença de barrancos que formam um leito com cerca de 3 m

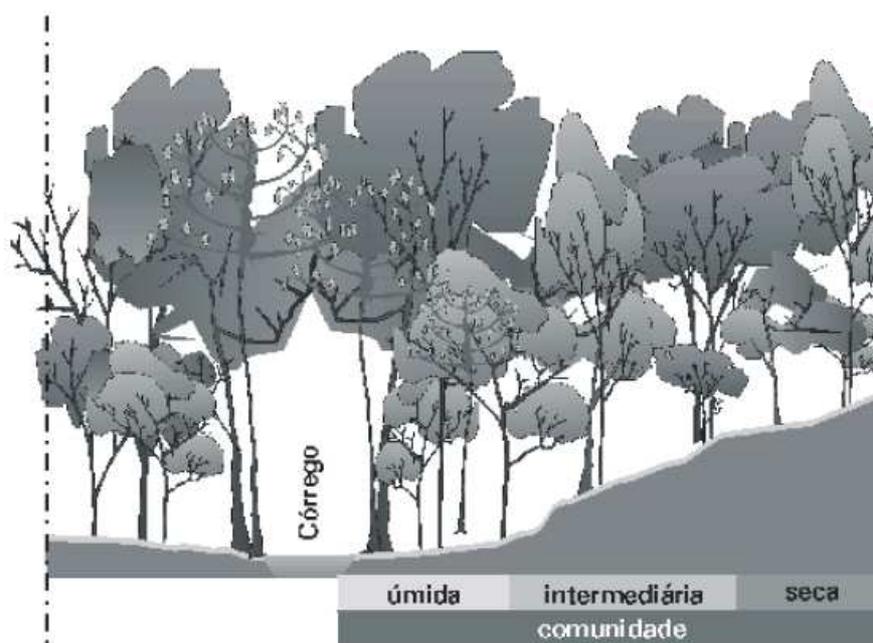
de profundidade (Figura 4-C). A jusante, a área torna-se mais plana e o leito torna-se bastante raso até perder seu caminho, com a água espalhando-se na superfície do terreno. Ali domina a Taquara (*Olyra taquara* Swaller), que divide a área com alguns indivíduos de samambaias arbóreas (*Cyathea* sp.) e poucos indivíduos de árvores de outras espécies. A área ocorre sobre Latossolo, com manchas ricas em cálcio e com afloramentos de plintita. Grande parte desta área está em terras planas a suavemente onduladas (Pereira *et al.* 1989; 1993; Silva Júnior 1995), havendo uma topografia mais acentuada na cabeceira. A tabela 1 sintetiza as características mais relevantes de cada mata de galeria para o presente estudo.

**Tabela 1.** Localização, características edáficas, largura e topografia das matas de galeria dos córregos Pitoco, Monjolo e Taquara, RECOR, Brasília-DF.

	PITOCO			MONJOLO			TAQUARA		
<b>Localização</b>	Porção	nordeste	da	Porção	nordeste	da	Porção	sudeste	da
	RECOR			RECOR (próxima ao Pitoco)			RECOR		
<b>Característica edáfica</b>	Predomina	Latossolo		Predomina	Latossolo		Predomina	Latossolo	
	Vermelho	na porção		Vermelho	com manchas		com manchas	ricas em	
	seca e	Gleissolo	mais	de Latossolo	Vermelho-		cálcio e	aflorações	de
	próximo	ao córrego		Amarelo			plintita		
<b>Largura</b>	Mata	mais larga	na	Largura	varia entre	120 e	Mata	mais estreita	na
	cabeceira	do córrego		160 m			cabeceira	(< 100 m)	
	(120 m – 160 m)								
<b>Topografia</b>	Moderadamente inclinada			Plana na cabeceira e mais inclinada à jusante			Acentuada na cabeceira do córrego		

Silva Júnior (1995), ao realizar levantamento das composições florística e fitossociológica e das propriedades do solo das Matas de Galeria dos córregos Pitoco, Monjolo e Taquara, identificou três comunidades florísticas de acordo com a posição no gradiente topográfico: comunidade úmida (margem do córrego), comunidade intermediária e

comunidade seca (borda da mata) (Figura 5). Os resultados apresentados por Silva Júnior para as três matas mostraram que as comunidades constituintes foram significativamente diferentes entre si na maioria das suas características físicas e químicas, em especial as comunidades seca e úmida de cada mata. O autor verificou ainda haver maior relação entre as comunidades de solos úmidos das três matas do que as comunidades de solos úmido e seco de uma mesma mata.



**Figura 5.** Ilustração indicando a divisão de uma mata de galeria em comunidades úmida, intermediária e seca.

Em todas as amostras de solo das matas de galeria do Pitoco, Monjolo e Taquara a textura foi classificada como argilosa ( $\geq 35\%$  de argila). No Pitoco, o solo da comunidade seca apresentou maior porcentagem de argila que a comunidade úmida, enquanto no Taquara registrou-se o inverso, com o solo da comunidade seca sendo menos argiloso que o da comunidade úmida. Na mata do Monjolo não houve diferença significativa entre as comunidades quanto à textura de seus solos (Tabela 2).

**Tabela 2.** Médias das porcentagens de argila e silte no solo das comunidades úmida e seca das matas do Pitoco, Monjolo e Taquara (Silva Júnior, 1995).

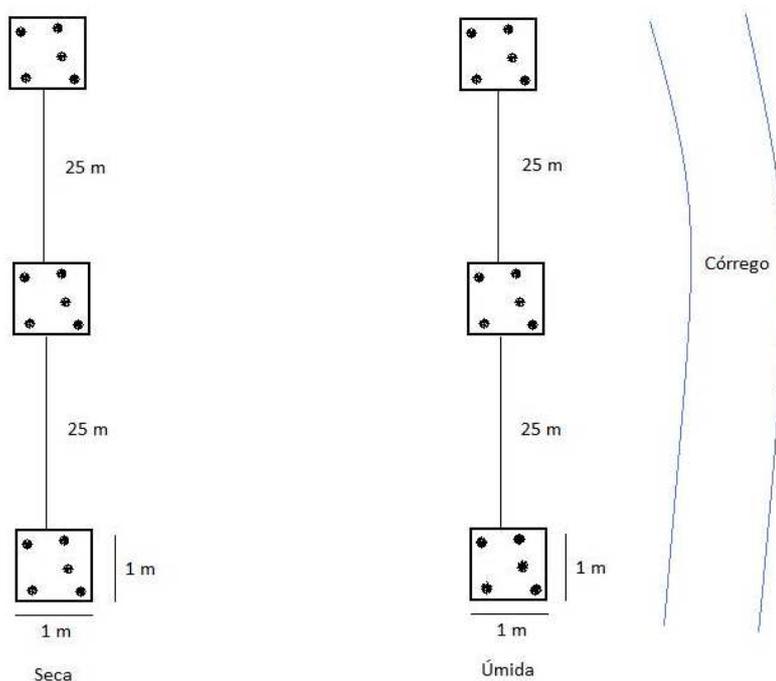
Textura (%)	Mata/Comunidade					
	Pitoco		Monjolo		Taquara	
	Úmida	Seca	Úmida	Seca	Úmida	Seca
Argila	49,4	57,5	56,6	54,8	55,6	45,3
Silte	19,0	19,0	16,6	16,1	16,9	16,7

## 5. Desenho experimental

### 5.1 Variações sazonais e espaciais da diversidade bacteriana do solo

O estudo foi conduzido nas matas de galeria dos córregos Pitoco, Monjolo e Taquara, cuja descrição encontra-se no item “Áreas de estudo”. Para o delineamento experimental desse capítulo, cada mata de galeria foi dividida de acordo com as comunidades florísticas determinadas pelas características edáficas e topográficas das matas, como proposto por Silva Júnior (1995). Como a região escolhida da mata do Taquara apresentava largura muito estreita e de difícil identificação da comunidade intermediária, optou-se pelo estudo apenas das comunidades úmida e seca de cada mata.

Foram demarcados dois transectos de 50 m paralelos aos córregos, sendo um estabelecido na comunidade seca e outro na comunidade úmida das matas. Em cada transecto, foram delimitadas parcelas de 1 x 1 m, nos pontos 0 m, 25 m e 50 m. Dentro das parcelas foram coletadas cinco amostras de solo para as análises químicas, físicas e biológicas, e uma sexta amostra para análise do teor gravimétrico do solo, de acordo com o descrito no tópico “Coletas e análises laboratoriais” (Figura 6).



**Figura 6.** Desenho esquemático da disposição dos transectos e parcelas nas comunidades úmida e seca das matas de galeria do Pitoco, Monjolo e Taquara, RECOR, Brasília - DF.

As áreas selecionadas foram amostradas no período entre setembro de 2010 e maio de 2011, para que se pudesse abranger as estações seca e chuvosa e os períodos de transição entre elas, seca/chuvosa e chuvosa/seca. As datas de coleta das amostras estão apresentadas na tabela 3. As áreas também foram amostradas duas semanas após incêndio acidental que ocorreu nos dias 8 e 9 de setembro de 2011, época caracterizada como transição entre estações seca e chuvosa, com a intenção de identificar possíveis efeitos do fogo sobre a comunidade bacteriana do solo das matas de galeria queimadas.

**Tabela 3.** Datas de coletas de amostras compostas de

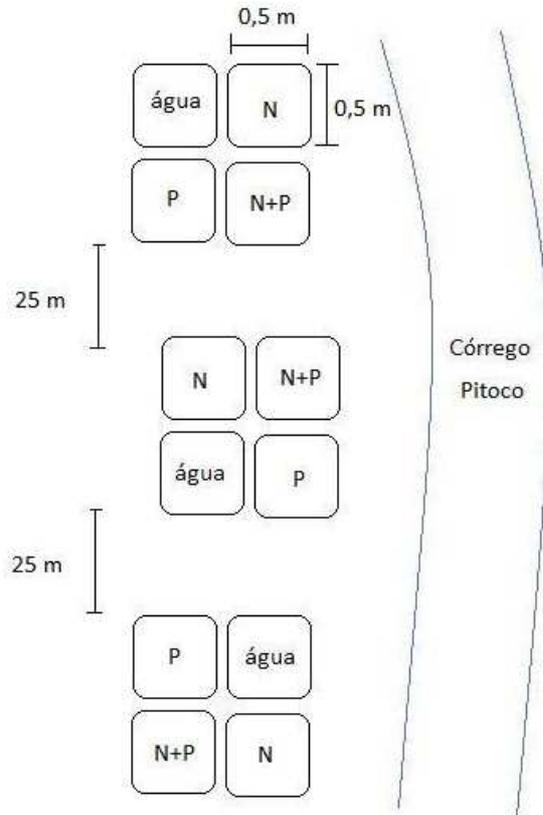
solo nas matas do Pitoco, Monjolo e Taquara da Reserva Ecológica do IBGE.

Estação	Data
Seca	03, 06 e 08/09/2010
Transição seca/chuva	08/10/2010
Chuvosa	20/12/2010
Transição chuva/seca	06/05/2011
Pós-fogo (Transição seca/chuva)	22/09/2011

## 5.2 Efeito de curto prazo da adição de água, nitrogênio e fósforo sobre as comunidades bacterianas do solo

Para verificar os efeitos dos primeiros eventos de precipitação após a estação seca na estrutura das comunidades bacterianas do solo, um experimento com adição artificial de água, nitrogênio e fósforo foi desenvolvido na comunidade úmida da mata de galeria do córrego Pitoco (RECOR, Brasília, DF) entre os dias 28 e 30 de setembro de 2010. Ao longo da comunidade úmida da mata de galeria do córrego do Pitoco foram estabelecidas três parcelas, distando 25 m umas das outras, as quais foram divididas em quatro subparcelas com dimensões de 50 cm x 50 cm, onde os tratamentos foram aplicados (Figura 7). No primeiro dia do experimento (28 de setembro), foram adicionados 1,25 L de água (equivalente a 5 mm de precipitação) nas subparcelas. Dentro de cada parcela, as subparcelas receberam tratamentos diferenciados: adição de água destilada (**água**); adição de água + amônio (**N**); adição de água + fosfato (**P**); e adição de água + amônio + fosfato (**N+P**). (Figura 7).

Segundo Parron (2004), ao final da estação seca há uma concentração de 35 µg/L de  $\text{PO}_4^{2-}$  e 1,3 mg/L de  $\text{NH}_4^+$  na solução obtida com a lixiviação da serapilheira (inclui deposição atmosférica e lixiviação do dossel) após as primeiras chuvas na comunidade úmida da mata do Pitoco. A adição dos nutrientes às subparcelas do presente experimento seguiu as concentrações determinadas pela autora em 1,25 L, tendo como fonte de amônio  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e como fonte de fosfato  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . No momento da aplicação dos tratamentos, retirou-se a serapilheira que se encontrava sobre o solo para evitar que a água adicionada ficasse retida sobre a vegetação morta ou ainda que, com a lixiviação da serapilheira no momento da adição de água, houvesse maior entrada de nutrientes no solo do que o desejado.



**Figura 7.** Desenho esquemático da disposição das parcelas e subparcelas empregadas no experimento instalado na comunidade úmida da mata de galeria do Pitoco, RECOR, Brasília, DF, durante o período de 28 a 30 de setembro de 2010. Dentro de cada parcela, as subparcelas receberam tratamentos diferenciados: adição de água destilada (**água**); adição de água + amônio (**N**); adição de água

+ fosfato (**P**); e adição de água + amônio + fosfato (**N+P**).

As coletas de solo foram realizadas antes da aplicação dos tratamentos e uma hora, 24 horas e 48 horas após a adição de água e nutrientes às subparcelas do experimento. Em cada subparcela, foram coletadas cinco amostras de solo (0-10 cm de profundidade) para análises biológicas e de concentrações de fósforo disponível, N-amoniaco e N-nítrico, e pH em água e CaCl<sub>2</sub>, e uma amostra para medição do teor gravimétrico.

## **6. Coletas e análises laboratoriais**

Cinco amostras de solo foram coletadas dentro de cada parcela do estudo, tendo sido posteriormente juntadas para formar uma amostra composta. As amostras foram coletadas com tubos de PVC com 5 cm de diâmetro em profundidade entre 0-10 cm, onde se encontra a maior atividade de microrganismos do solo.

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

Em laboratório, as amostras de solo foram peneiradas em peneira com malha de 2 mm e fracionadas. As frações utilizadas para determinação de pH e parâmetros físico-químicos foram secas a temperatura ambiente para posterior análise; aquelas destinadas a análises moleculares foram congeladas em freezer a -20 °C.

### **6.1. Determinação do teor de umidade do solo**

O teor de umidade do solo foi obtido pelo método gravimétrico, que determina o percentual de água entre o peso do solo fresco e seco (EMBRAPA, 1997). Em todas as coletas, foram retiradas amostras de solo, na profundidade de 0 – 10 cm, dentro das parcelas

estabelecidas. Em laboratório, procedeu-se a pesagem do solo úmido (peso fresco), secagem em estufa a 105° C por 72 horas e pesagem do solo seco (peso seco).

## **6.2. Determinação do pH**

Dez gramas de solo previamente secos a temperatura ambiente foram utilizados para determinação do pH em água e em solução de CaCl<sub>2</sub> (0,01 M) na proporção 1:2,5. Após a agitação com bastão de vidro e repouso por uma hora, foi realizada a leitura do pH com auxílio de um potenciômetro.

## **6.3. Determinação das concentrações de N-nítrico (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e N-amoniacoal (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)**

As concentrações de N-nítrico e N-amoniacoal nas amostras de solo fresco foram determinadas após extração com 25 ml de KCl 1M, com agitação por 60 minutos e filtragem em papel filtro. A concentração de nitrato foi determinada por uma análise espectrofotométrica direta (absorção em UV) (Mulvaney, 1996), medindo-se absorvância da solução extraída nos seguintes comprimentos de onda: 218 nm e 228 nm (cuja diferença entre eles é proporcional à concentração de N-nítrico); e 254 nm e 280 nm (a fim de eliminar a interferência de substâncias húmicas provenientes da matéria orgânica (Meier, 1991)). Já para determinação de N-amoniacoal foi utilizado teste com reagente Nessler para posterior análise em espectrofotômetro a 425 nm. Todos os resultados foram expressos com base em peso de solo seco à 105 °C. Todas as leituras foram realizadas em espectrofotômetro Spectramax.

## **6.4. Extração de DNA das amostras de solo**

A extração de DNA total das amostras de solo foi feita por meio do kit FastDNA SPIN (MP Bio) para extração de DNA de microrganismos em amostra de solo. A extração foi realizada de acordo com o protocolo fornecido pelo kit. O DNA extraído foi quantificado em Qubit Fluorometer (Invitrogen) seguindo indicações do fabricante.

## **6.5. Análise dos perfis das comunidades bacterianas**

Perfis da comunidade bacteriana foram avaliados através da técnica de RISA (Ribosomal Inter Space Analysis), que permite avaliar a riqueza de comunidades microbianas através de um perfil de bandas de sequências de DNA, discriminadas pelas diferenças de seus tamanhos, dispostas em gel de acrilamida 8%.

O espaço intergênico entre as regiões codificadas dos RNAs ribossômicos 16S e 23S foi amplificada a partir de quatro nanogramas, em média, do DNA extraído do solo seguindo o método utilizado por Borneman & Triplett (1997). A mistura da reação com volume total de 20 µl consistiu de tampão da Tap polimerase com concentração final 1X (Tris-HCl 100 mM pH 8,4, 500 mM de KCl, 1% Triton X-100), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mM de desoxirribonucleosídeos trifosfatados (dNTPs), 2,0 U de Taq DNA polimerase (Phoneutria, Belo Horizonte, BR) e 5 pmol de cada oligonucleotídeo. Os oligonucleotídeos iniciadores universais utilizados foram 1406F (5` TGYACACACCGCCCGT 3`) e L1R (5` CAAGGCATCCACCGT 3`). O ciclo de amplificação utilizado foi 95 °C por três minutos; 29 ciclos de 60 segundos a 95 °C, 90 segundos a 53 °C e três minutos a 72 °C; e extensão final de 30 minutos a 72 °C. Após os ciclos, a temperatura foi mantida a 10 °C até a retirada das reações do termociclador. Três microlitros da reação de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, que posteriormente foi corado com brometo de etídeo.

Após analisar a qualidade da sequência amplificada, 17 µl da reação foram aplicados em gel de poliacrilamida a 8 % e separados por eletroforese por cinco horas e meia a 150 V. Em três poços de cada gel de RISA, aplicou-se 10 µl de marcador 1 kb ladder (Invitrogen). O perfil de bandas referente aos produtos da amplificação por PCR foi visualizado após coloração com brometo de etídeo. A metodologia de separação do perfil bacteriano foi realizada em replicata.

## **6.6. Sequenciamento de fragmentos de DNA**

Após as análises dos géis de RISA, foram escolhidas bandas para a identificação da sequência. A escolha das bandas foi feita utilizando-se como parâmetro a sua intensidade e

presença/ausência em determinados perfis. O protocolo estabelecido por Marshall *et al.* (2003) foi utilizado com as seguintes modificações: para a excisão da banda do gel, utilizou-se uma lâmina de gillete previamente higienizada. A banda permaneceu em 30 µl de água MilliQ por três dias a fim de liberar o DNA da acrilamida. Após este prazo, uma nova amplificação foi feita utilizando-se os mesmos parâmetros de PCR descritos anteriormente com a condição de substituir o valor equivalente de água MilliQ e DNA purificado pela água em que a banda estava embebida. Após amplificação, seguiu-se à quantificação do DNA em Qubit Fluorometer (Invitrogen) e à confirmação da qualidade da banda reamplificada em gel de agarose. Por último, realizou-se purificação do *amplicon* com QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN).

O sequenciamento pelo método de Sanger foi realizado na unidade de sequenciamento do laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília. A identificação das sequências com o organismo mais similar foi feita por meio do banco de dados NCBI-BLAST (National Center for Biotechnology Information - Basic Local Alignment Search Tool).

## **6.7. Análise dos resultados**

A distribuição normal dos dados foi testada através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados de pH do solo, conteúdo gravimétrico de água e nutrientes foram submetidos a análise de variância (ANOVA) para testar diferenças de suas médias ao longo do período de estudo, entre porções úmida e seca das matas e entre subparcelas no experimento de adição de nutrientes. O nível de significância adotado foi de 5% e utilizou-se o programa R 2.12.1 para Windows. A fim de identificar possíveis padrões de influência dos parâmetros físico-químicos sobre as comunidades nos diferentes tempos amostrais, diagramas de ordenação, gerados por análise dos componentes principais (PCA), foram construídos com o programa PC-ORD versão 5.12 (McCune & Mefford, 2006).

A análise dos perfis de bandas dos géis de RISA foi realizada utilizando-se o programa de *software* BioNumerics versão 4.5, que cria uma matriz binária para comparações quantitativas entre comunidades, determinando índices de similaridade. Utilizou-se o coeficiente de similaridade DICE (Dice, 1945), que atribui pesos iguais à presença ou ausência

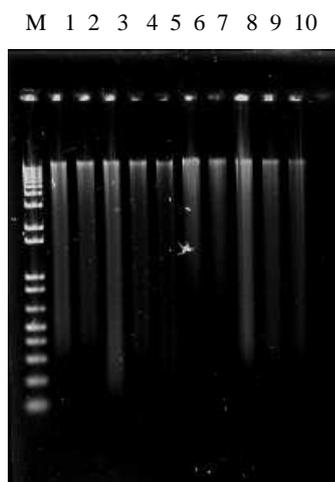
de característica. O agrupamento das amostras foi feito utilizando-se o método UPGMA (Unweight pair-group method) (Sneath & Sokal, 1973 *apud* Johnson *et al.* 2003), que deve ser aplicado quando se pretende identificar amostras que provavelmente venham a gerar padrões de bandas semelhantes (Fromien *et al.*, 2002). A partir do algoritmo UPGMA, foram construídos dendrogramas para ilustrar a relação de similaridade entre os perfis das comunidades bacterianas.

## 7. Resultados

### 7.1 Variações sazonais e espaciais da diversidade bacteriana do solo e efeito do fogo sobre comunidades bacterianas

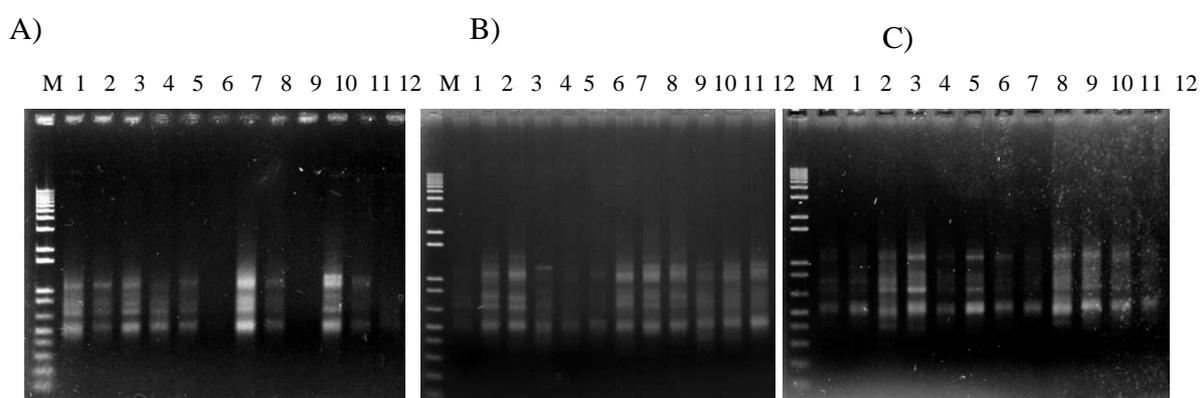
#### 7.1.1 Extração de DNA e PCR

A quantidade média de DNA obtida após extração foi de 20 ng/μl, sendo suficiente para amplificação por PCR (Figura 8). No entanto, devido à presença de grandes concentrações de matéria orgânica no solo das matas de galeria, o DNA extraído não se encontrava em condições ideais para uma aplicação direta nas reações de PCR, devido à provável interferência de ácidos húmicos nas reações enzimáticas de amplificação. Dessa forma, fez-se necessário um passo adicional de diluição do DNA extraído em água milli-Q para que se atenuasse a interferência desses compostos.



**Figura 8.** Gel de agarose 1%. Extração de DNA. Da esquerda para a direita: M – marcador 1 kb ladder; 1-3 – amostras comunidade úmida Pitoco; 4-6 – amostras comunidade seca Pitoco; 7-9 – amostras comunidade úmida Monjolo; 10 – amostra comunidade seca Monjolo. Todas as amostras desse gel foram coletadas na estação seca.

Em decorrência da qualidade do DNA extraído e da necessidade do passo adicional de diluição, a amplificação por PCR com os primers L1R e 1406F teve de ser repetida várias vezes a fim de se chegar a um resultado satisfatório, em que qualidade e quantidade dos DNAs amplificados fossem suficientes para serem, posteriormente, submetidos à análise em gel de poliacrilamida. Na figura 9, são apresentados géis de agarose 1% com amostras de DNA amplificados por PCR, cuja qualidade e quantidade foram consideradas satisfatórias para aplicação em gel de RISA.



**Figura 9.** Géis de agarose 1%. Produtos de amplificação por PCR com primers L1R e 1406F de amostras de solo coletadas nas matas do Pitoco (A), Monjolo (B) e Taquara (C) durante estação seca (1-6) e estação chuvosa (7-12). Da esquerda para a direita: M – marcador 1 kb ladder; 1-3 e 7-9 - comunidade úmida; 4-6 e 10-12 – comunidade seca.

### 7.1.2 Perfis das comunidades bacterianas (RISA) e variáveis de solo

A análise dos perfis de RISA 16S-23S rDNA do solo das matas do Pitoco, Monjolo e Taquara mostraram padrões de agrupamentos entre comunidades bacterianas identificáveis pelos dendrogramas apresentados a seguir. No entanto, foram observadas diferenças entre perfis de triplicatas biológicas, que muito frequentemente não se agruparam no mesmo *cluster* e apresentaram grandes variações do índice de similaridade.

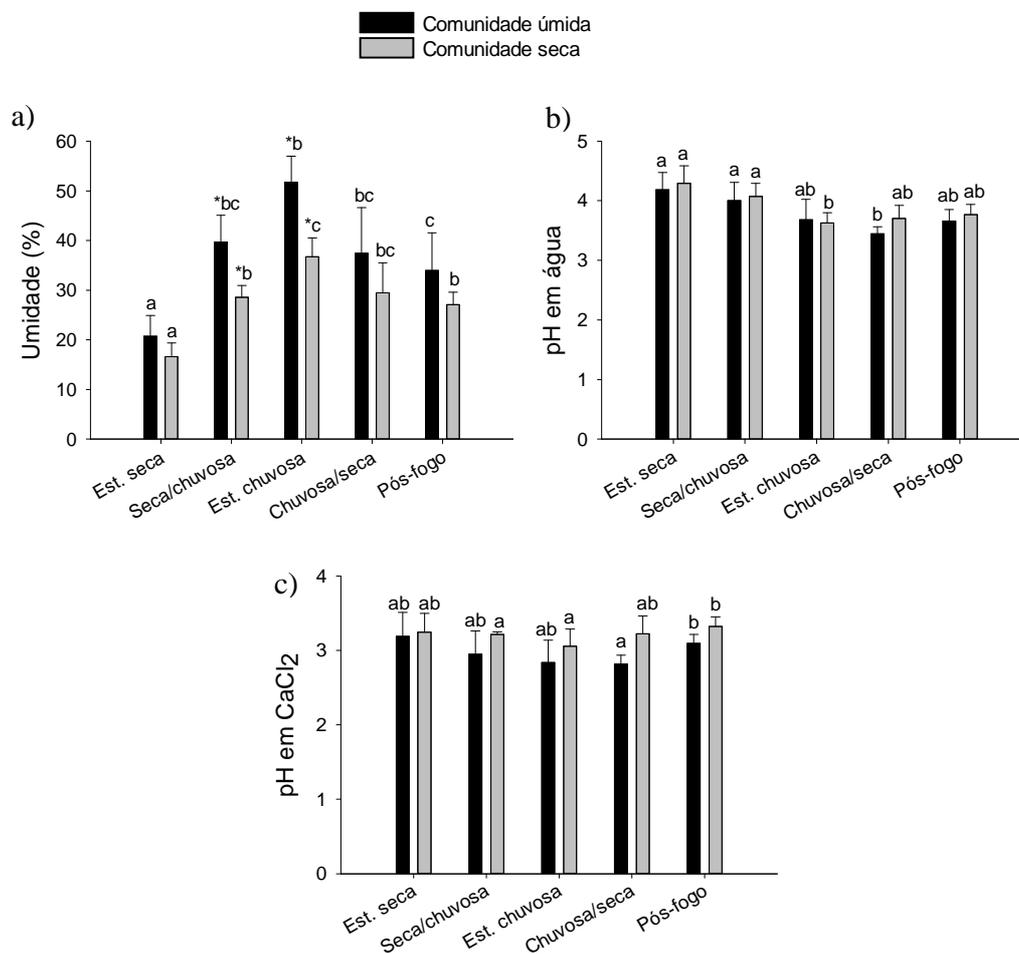
## **I) Mata do Pitoco**

### *Variáveis de solo*

A sazonalidade da precipitação influenciou de forma significativa a umidade do solo da mata do Pitoco (Figuras 2 e 10-a). Na estação seca, o teor de umidade do solo foi significativamente inferior a todos os outros períodos de coleta, chegando a ser 30% menor que o registrado na estação chuvosa. A comunidade seca da mata apresentou teores médios de umidade de 16,6 % na estação seca, 28,6 % na transições seca/chuva, 36,8 % na estação chuvosa e 29,5 % na transição chuva/seca. Já na comunidade úmida, a umidade do solo ao longo da sazonalidade da precipitação foi de 20,7 % na estação seca, 39,7 % na transição seca/chuva 51,7 % na estação chuvosa e 37,4 % na transição chuva/seca (Figura 10-a).

O gradiente topográfico também influenciou a umidade do solo. Na estação chuvosa e na transição entre estações seca e chuvosa a umidade do solo na comunidade úmida foi superior ao registrado na comunidade seca (Figura 10-a).

O pH em água variou entre 3,4 e 4,3, enquanto em  $\text{CaCl}_2$  a variação foi menor, entre 2,8 e 3,3 (Figura 10-b e 10-c). Não houve variação significativa do pH ao longo do gradiente topográfico da mata, mas houve variação sazonal. Na comunidade seca, o pH em água na estação seca e na transição seca/chuva foi significativamente superior ao registrado na estação chuvosa (Figura 10-b). Na comunidade úmida, a estação seca e a transição seca/chuva apresentaram pH significativamente superior ao da transição chuva/seca. Adicionalmente, os valores de pH em  $\text{CaCl}_2$  no pós-fogo foram significativamente superiores aos registrados na transição seca/chuva e na estação chuvosa para a porção seca, e superiores à transição chuva/seca na porção úmida da mata (Figura 10-c).

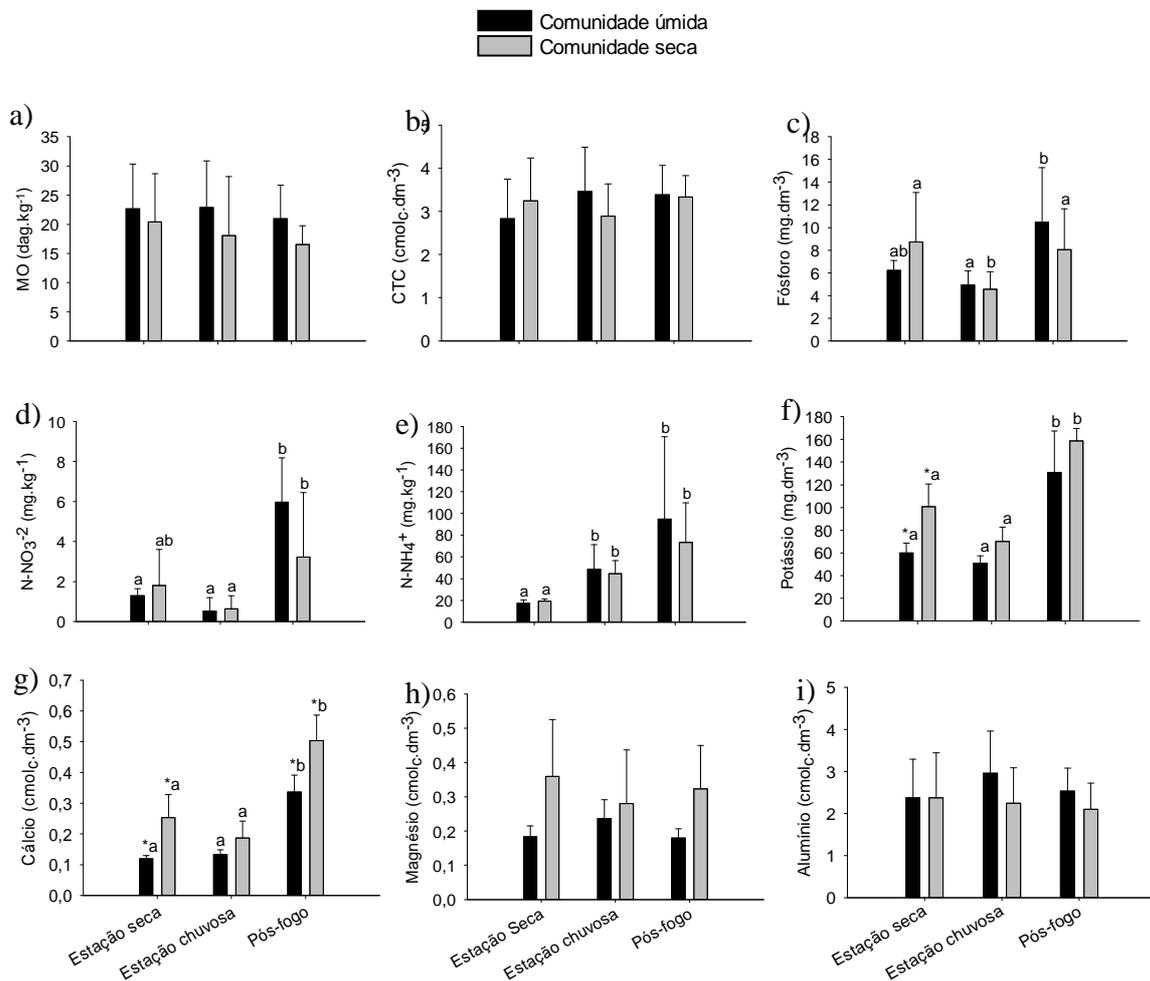


**Figura 10.** Valores médios do (a) teor de umidade (%) e (b) pH em água e (c) em CaCl<sub>2</sub> das amostras de solo (0-10 cm de profundidade) coletadas nas comunidades úmida e seca da mata de galeria do córrego Pitoco nas estações seca e chuvosa e transição entre elas (agosto/2010 a maio/2011) e após queimada ocorrida em setembro/2011. As barras verticais representam os desvios padrão, os asteriscos indicam diferenças significativas entre comunidades úmida e seca no mesmo período amostral ( $p < 0,05$ ) e as letras indicam diferenças significativas entre as estações e transições climáticas dentro da mesma posição no gradiente topográfico ( $p < 0,05$ ).

Os valores de CTC (2,8 a 3,5  $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$ ) (Figura 11-b) e as concentrações de matéria orgânica (16,5 a 22,9  $\text{dag.kg}^{-1}$ ) (Figura 11-a), magnésio (0,2 e 0,3  $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$ ) (Figura 11-h) e alumínio (de 2,1 a 3,0  $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$ ) (Figura 11-i) não apresentaram diferenças significativas entre os períodos de coleta ou em função do gradiente topográfico.

As concentrações de potássio variaram entre 51,0 e 158,7  $\text{mg.dm}^{-3}$  e as de cálcio, entre 0,1 e 0,5  $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$  com diferenças significativas no período pós-fogo quando as concentrações de potássio e cálcio foram de duas a três vezes maiores que as encontradas nas estações seca e chuvosa (Figura 11-f e 11-g). No solo da comunidade seca, as concentrações desses nutrientes foram de 1,5 a 2 vezes maiores que na porção úmida durante a estação seca. No pós-fogo, a concentração de cálcio também foi superior na porção seca da mata.

As concentrações médias de  $\text{N-NO}_3^-$  e  $\text{N-NH}_4^+$  no solo da mata do Pitoco variaram entre 1,3 e 6,0  $\text{mg.kg}^{-1}$  e entre 17,1 e 94,9  $\text{mg.kg}^{-1}$ , respectivamente. As maiores concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  foram encontradas no período pós-fogo sendo o dobro das observadas nas estações seca e chuvosa (Figura 11-d). As concentrações de  $\text{N-NH}_4^+$  foram menores na estação seca, cujos valores foram a metade dos registrados da estação chuvosa e um terço das concentrações do período pós-fogo (Figura 11-e). Já a concentração de fósforo disponível variou entre 4,6 e 10,5  $\text{mg.dm}^{-3}$ , e as menores concentrações desse nutriente em ambas as posições do gradiente topográfico foram determinadas nas amostras da estação chuvosa (Figura 11-c).

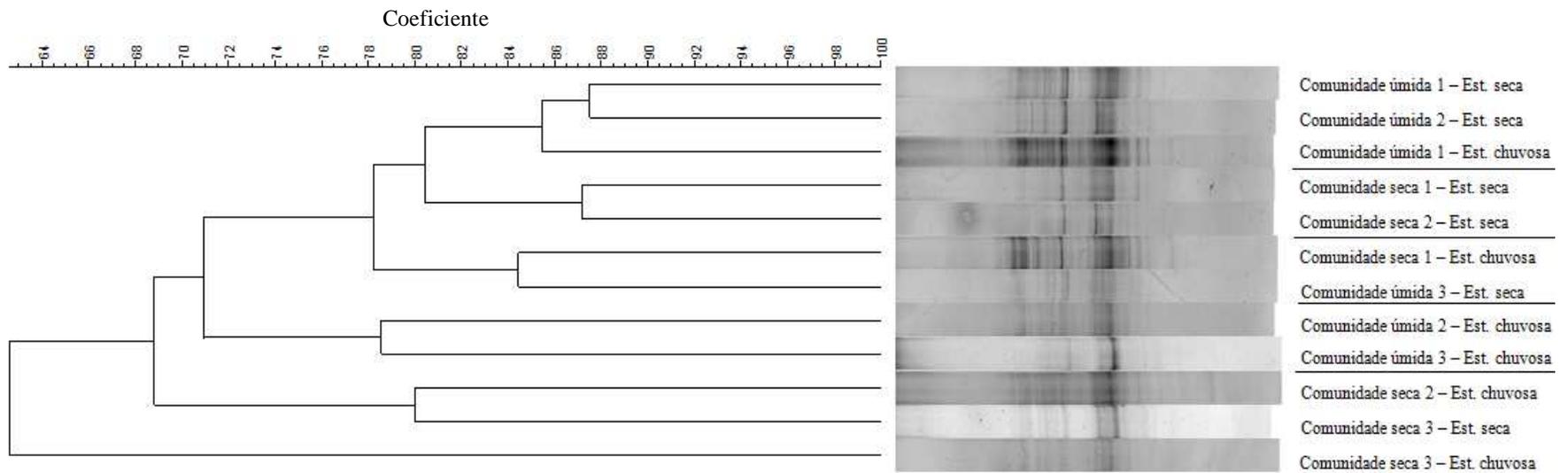


**Figura 11.** Valores médios de (a) matéria orgânica (MO) (dag.kg<sup>-1</sup>), (b) capacidade de troca catiônica (CTC) (cmol<sub>c</sub>.dm<sup>-3</sup>), (c) fósforo (mg.dm<sup>-3</sup>), (d) potássio (mg.dm<sup>-3</sup>), (e) N-nítrico (mg.kg<sup>-1</sup>), (f) N-amoniaco (mg.kg<sup>-1</sup>), (g) cálcio (cmol<sub>c</sub>.dm<sup>-3</sup>), (h) magnésio (cmol<sub>c</sub>.dm<sup>-3</sup>) e (i) alumínio (cmol<sub>c</sub>.dm<sup>-3</sup>) no solo (0-10 cm de profundidade) das comunidades úmida e seca da mata de galeria do córrego Pitoco nas estações seca e chuvosa, e após queimada ocorrida em setembro/2011. As barras verticais representam os desvios padrão, os asteriscos indicam diferenças significativas entre as comunidades úmida e seca dentro de um mesmo período amostral ( $p < 0,05$ ) e as letras indicam diferenças significativas entre as estações e pós-fogo dentro da mesma posição no gradiente topográfico ( $p < 0,05$ ).

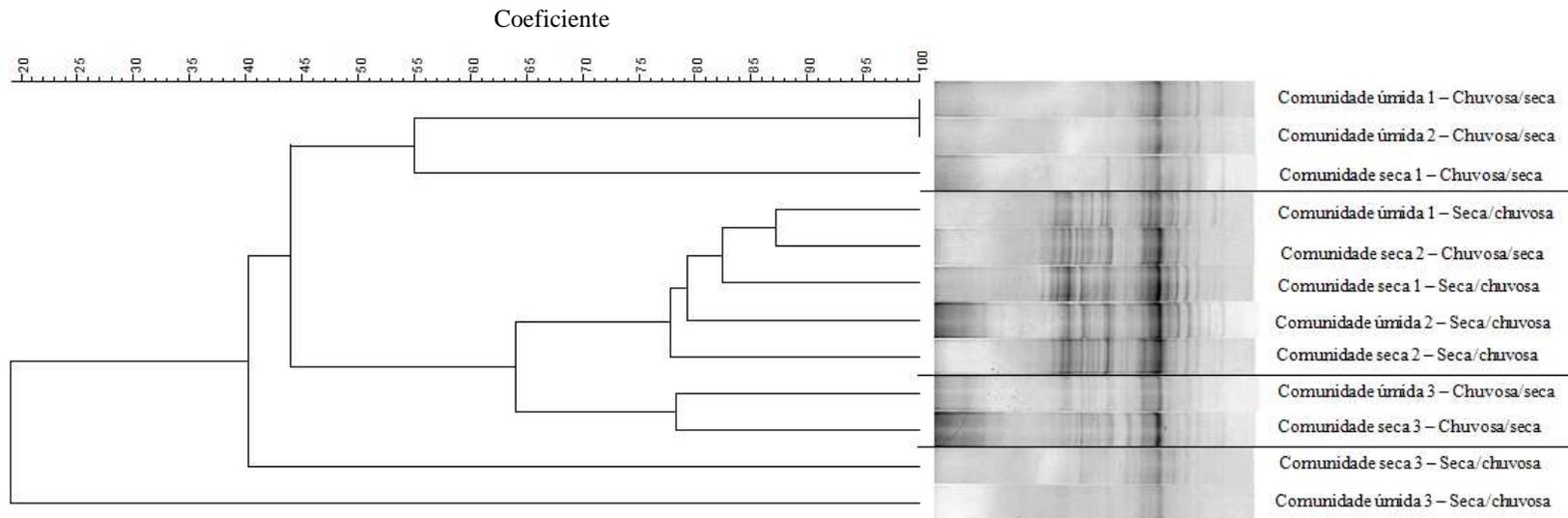
*Variações sazonais e espaciais da diversidade bacteriana*

Na mata do córrego Pitoco, os perfis bacterianos dos solos coletados nas estações seca e chuvosa apresentaram um agrupamento influenciado principalmente pelo gradiente topográfico (Figura 12). No dendrograma houve formação de pequenos grupos compostos por comunidades de bactérias pertencentes, em sua maioria, à mesma posição no gradiente topográfico, com índices de similaridade que variaram entre 80 e 88%. Por outro lado, a similaridade entre perfis de porções distintas do gradiente topográfico variou entre 63 e 85% (Figura 12).

Já na comparação entre transições seca-chuva e chuva-seca os agrupamentos entre perfis bacterianos foram mais influenciados pela sazonalidade da precipitação, não sendo perceptível o efeito do gradiente topográfico (Figura 13). A maioria dos perfis da transição seca-chuva se agrupou com coeficientes de similaridade entre 86 e 95%, exceto por dois perfis de porções distintas do gradiente topográfico que apresentaram apenas 20 a 40% de similaridade com o restante da árvore hierárquica. Os perfis da transição chuva-seca também formaram agrupamentos esparsos com coeficientes de similaridade que variaram entre 47 e 100%. Perfis de diferentes transições estacionais apresentaram variação dos índices de similaridade entre 46 e 92% (Figura 13).



**Figura 12.** Dendrograma (UPGMA) dos perfis das comunidades bacterianas presentes nos solos da mata de galeria do Pitoco, em duas posições do gradiente topográfico (comunidade seca e comunidade úmida) e em diferentes períodos da sazonalidade de precipitação (estação seca e estação chuvosa), utilizando o coeficiente de similaridade de DICE.

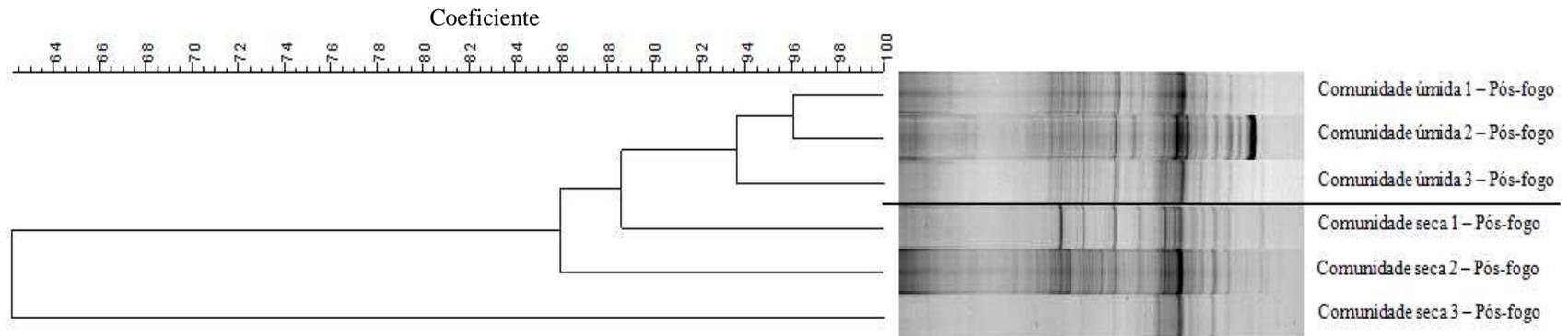


**Figura 13.** Dendrograma (UPGMA) dos perfis das comunidades bacterianas presentes nos solos da mata de galeria do Pitoco, em duas posições do gradiente topográfico (comunida seca e comunidade úmida) e nas transições entre estação seca e estação chuvosa e entre estação chuvosa e estação seca, utilizando o coeficiente de similaridade de DICE.

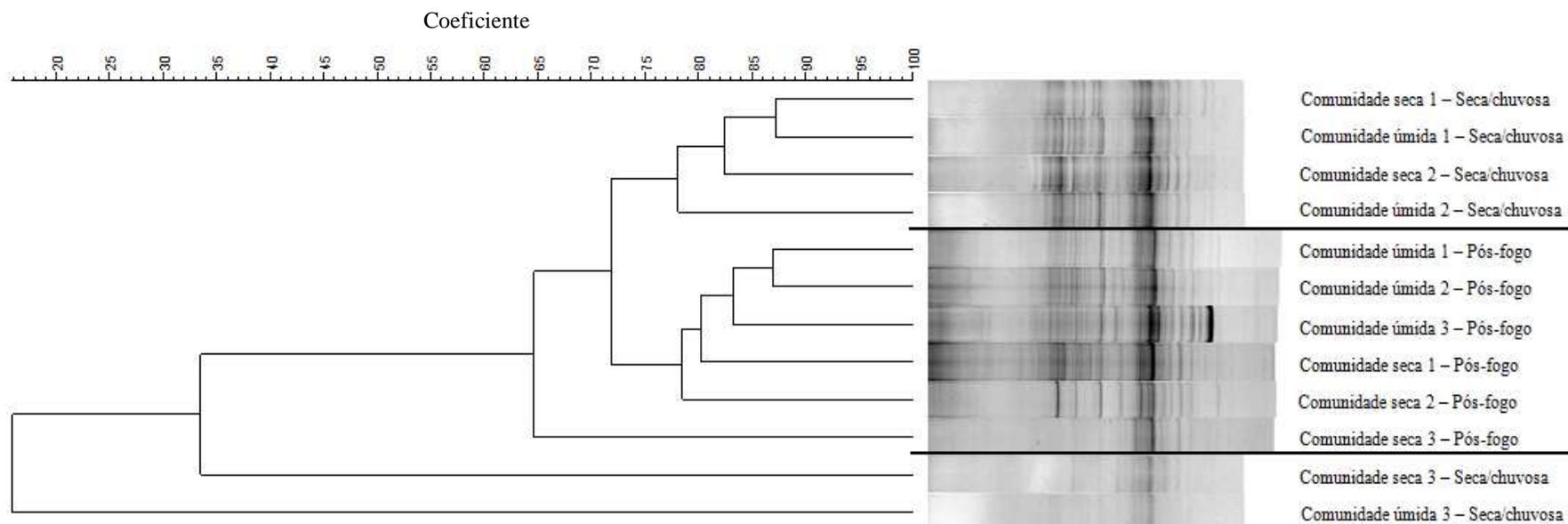
### *Efeitos do incêndio acidental sobre a diversidade bacteriana*

No período após incêndio acidental, época correspondente à transição entre estações seca e chuvosa de 2011, observou-se ainda influência do gradiente topográfico sobre as comunidades de bactérias do solo, havendo separação das amostras das comunidades seca e úmida. Após o incêndio, os perfis da porção úmida da mata foram mais similares entre si (93 - 96%) do que os perfis da porção seca (62 - 89%). Os perfis da porção úmida da mata apresentaram 62 a 89% de similaridade com os perfis da porção seca (Figura 14).

Na comparação entre os períodos pós-fogo e a transição entre estações seca-chuva do ano de 2010 (Figura 15), houve uma separação nítida entre as comunidades de bactérias provenientes desses dois períodos. A similaridade entre perfis após a queimada (65 a 90%) foi superior à similaridade entre perfis da transição seca-chuva (15 a 87%). Os perfis do período pós-fogo apresentaram entre 15 e 72% de similaridade com os perfis da transição seca-chuva (Figura 15). Houve ainda influência diferenciada do gradiente topográfico antes e após o incêndio. No período anterior ao incêndio não houve formação de grupos de perfis de acordo com a posição no gradiente topográfico, o que se mostrou bem diferente no período pós-fogo, onde o gradiente topográfico foi um fator preponderante no agrupamento das comunidades bacterianas (Figuras 13, 14 e 15).



**Figura 14.** Dendrograma ilustrando a relação de similaridade (UPGMA com coeficiente de DICE) entre perfis das comunidades bacterianas presentes em solos da mata de galeria do Pitoco em duas posições do gradiente topográfico (comunidade seca e comunidade úmida) duas semanas após queimada acidental ocorrida em setembro de 2011.



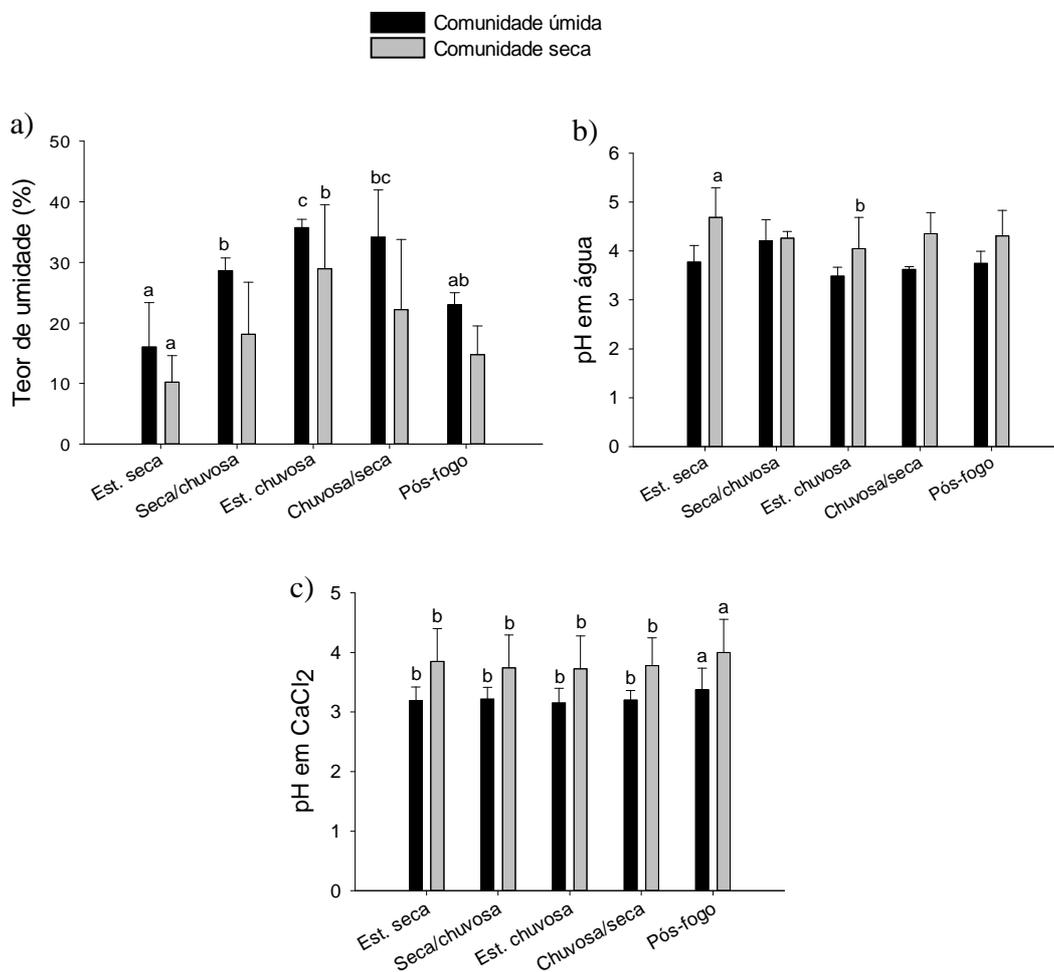
**Figura 15.** Dendrograma ilustrando a relação de similaridade (UPGMA com coeficiente de DICE) entre perfis das comunidades bacterianas presentes em solos da mata de galeria do Pitoco em duas posições do gradiente topográfico (comunidade seca e comunidade úmida) e na transição entre estações seca e chuvosa de 2010 e de 2011, sendo que no segundo ano as coletas de solo foram realizadas duas semanas após queimada acidental ocorrida na mata.

## **II) Mata do Monjolo**

### *Variáveis de solo*

Na mata do Monjolo, o teor de umidade do solo apresentou diferenças significativas entre períodos de coleta, o que não ocorreu entre diferentes posições do gradiente topográfico. Na comunidade úmida, o solo apresentou teores médios de umidade que variaram entre 16,0 % na estação seca e 35,7 % na estação chuvosa, havendo diferenças significativas entre os períodos amostrados. Na comunidade seca, o teor de umidade do solo variou entre 10,0 %, na estação seca, e 28,9 % na estação chuvosa, períodos que apresentaram teores de umidade estatisticamente diferentes. Nas coletas referentes às transições entre estações, incluindo o pós-fogo, as amostras apresentaram valores intermediários de umidade no solo (Figura 16-a).

As comunidades seca e úmida da mata do Monjolo também não diferiram significativamente quanto ao pH do solo. O pH em água variou entre 3,6 e 4,3, sendo que as médias mais baixas foram determinadas na estação chuvosa. O pH na comunidade seca foi significativamente inferior na estação chuvosa quando comparada à estação seca. Já o pH medido em  $\text{CaCl}_2$  variou de 3,2 a 4,0. No período pós-fogo, tanto a comunidade seca como a comunidade úmida da mata apresentaram valores significativamente superiores aos registrados antes do incêndio acidental (Figura 16-b e 16-c).

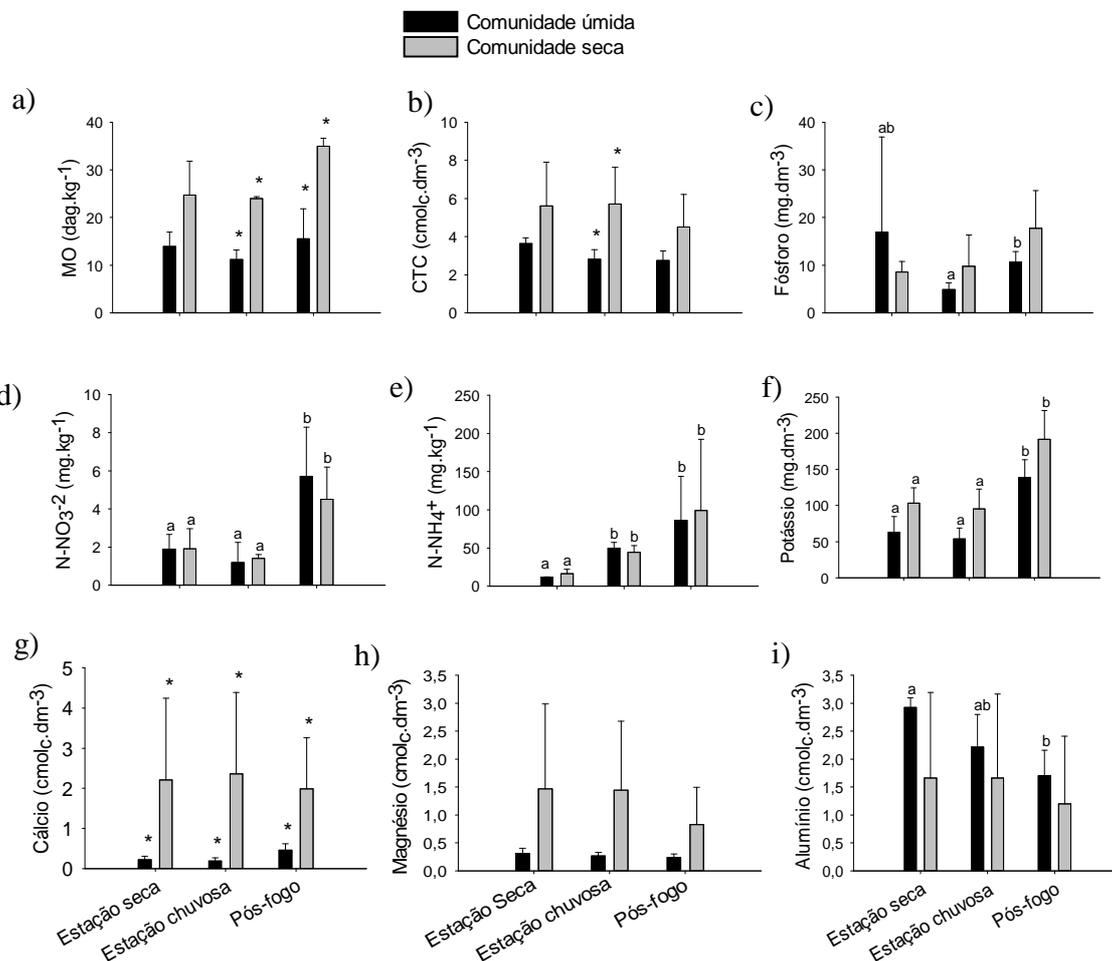


**Figura 16.** Valores médios do (a) teor de umidade (%) e (b) pH em água e (c) em CaCl<sub>2</sub> das amostras de solo (0-10 cm de profundidade) coletadas nas comunidades úmida e seca da mata de galeria do córrego Monjolo nas estações seca e chuvosa e transição entre elas (agosto/2010 a maio/2011) e após queimada ocorrida em setembro/2011. As barras verticais representam os desvios padrão e as letras indicam diferenças significativas entre as estações e transições climáticas dentro da mesma posição no gradiente topográfico ( $p < 0,05$ ).

A concentração de matéria orgânica (MO) e a capacidade de troca catiônica (CTC) do solo apresentaram diferenças significativas entre as duas porções do gradiente topográfico, porém não variaram entre as estações. A concentração de MO da comunidade seca variou entre 24 e 35  $\text{dag.kg}^{-1}$ , sendo os valores significativamente superiores aos da comunidade úmida (11 a 16  $\text{dag.kg}^{-1}$ ) tanto na estação chuvosa como após o incêndio da área (Figura 17-a). O mesmo foi observado para a CTC, com variação entre 2,8 e 5,7  $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$  e média significativamente superior na comunidade seca em comparação com a úmida durante a estação chuvosa (Figura 17-b).

A concentração de cálcio na comunidade seca (0,2 e 0,5  $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$ ) foi de cinco a dez vezes inferior a da comunidade úmida (2,0 e 2,4  $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$ ), independente do período amostrado (Figura 17-g). As concentrações de potássio, alumínio e magnésio não diferiram significativamente em função do gradiente topográfico, mas sim em função da sazonalidade de precipitação ou do incêndio acidental. As concentrações de potássio variaram entre 53,7 e 191,7  $\text{mg.dm}^{-3}$  e aumentaram de duas a quatro vezes no período pós-fogo em relação às estações seca e chuvosa (Figura 17-f). A concentração de alumínio no solo variou entre 1,2 a 3,0  $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$ . Na comunidade úmida, a concentração de alumínio foi significativamente superior na estação seca em relação ao pós-fogo (Figura 17-i). Por último, a concentração de magnésio variou entre 0,2 e 1,5  $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$  e não diferiu significativamente ao longo do gradiente topográfico ou em função da sazonalidade de precipitação ou do incêndio acidental (Figura 17-h).

As concentrações de fósforo variaram entre 4,9 e 17,7  $\text{mg.dm}^{-3}$ , e os valores medidos no período pós-fogo foram até quatro vezes superiores aos registrados na estação chuvosa para a comunidade úmida da mata (Figura 17-c). A concentração de  $\text{N-NO}_3^-$  variou entre 1,2 e 5,7  $\text{mg.kg}^{-1}$ . Na estação seca encontraram-se as menores concentrações que foram até três vezes menores que na estação chuvosa e no período pós-fogo (Figura 17-d). Já a concentração de  $\text{N-NH}_4^+$  foi significativamente menor na estação seca em comparação à chuvosa e ao período pós-fogo, tendo apresentado uma variação de 11,9 a 99,2  $\text{mg.kg}^{-1}$  (Figura 17-e).



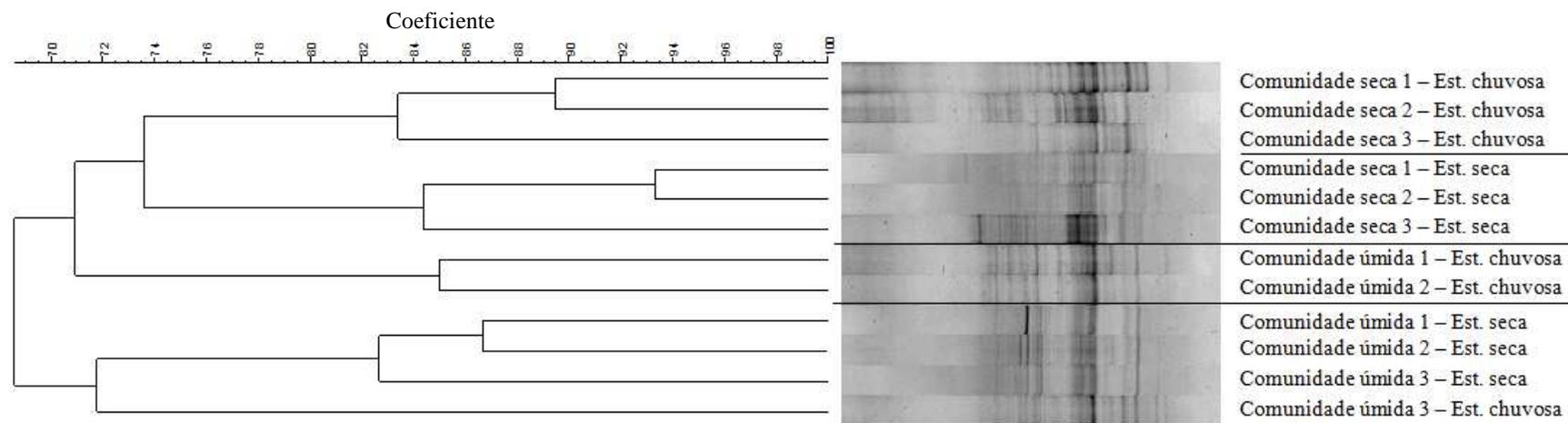
**Figura 17.** Valores médios de (a) matéria orgânica (MO) (dag.kg<sup>-1</sup>), (b) capacidade de troca catiônica (CTC) (cmol<sub>c</sub>.dm<sup>-3</sup>), (c) fósforo (mg.dm<sup>-3</sup>), (d) potássio (mg.dm<sup>-3</sup>), (e) N-nítrico (mg.kg<sup>-1</sup>), (f) N-amoniaco (mg.kg<sup>-1</sup>), (g) cálcio (cmol<sub>c</sub>.dm<sup>-3</sup>), (h) magnésio (cmol<sub>c</sub>.dm<sup>-3</sup>) e (i) alumínio (cmol<sub>c</sub>.dm<sup>-3</sup>) no solo (0-10 cm de profundidade) das comunidades úmida e seca da mata de galeria do córrego Monjolo nas estações seca e chuvosa, e após queimada ocorrida em setembro/2011. As barras verticais representam os desvios padrão, os asteriscos indicam diferenças significativas entre as comunidades úmida e seca dentro de um mesmo período amostral ( $p < 0,05$ ) e as letras indicam diferenças significativas entre as estações e pós-fogo dentro da mesma posição no gradiente topográfico ( $p < 0,05$ ).

### *Variações sazonais e espaciais da diversidade bacteriana*

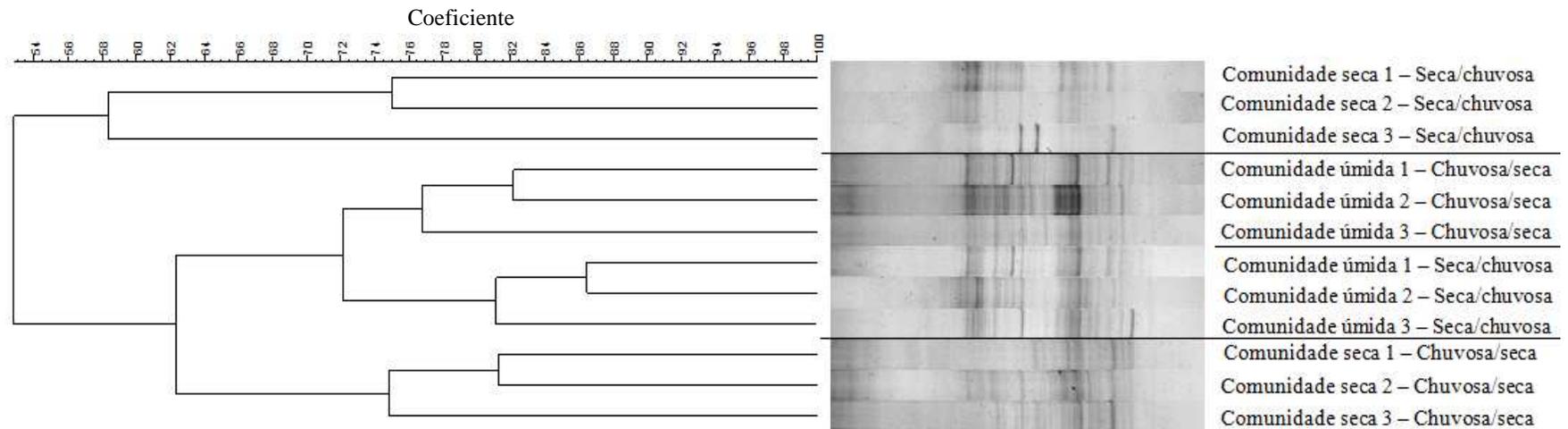
Os perfis de amostras de solo coletadas na Mata do Monjolo indicaram diferenciação da comunidade de bactérias em função da sazonalidade de precipitação e da posição no gradiente topográfico (Figuras 18, 19, 20). Para a porção seca da mata, os perfis de diversidade de espécies apresentaram 74% de similaridade entre estações seca e chuvosa, enquanto na porção úmida, a similaridade entre as duas estações foi, em média, 71% (Figura 18).

Na comparação entre transições seca-chuva e chuva-seca, os perfis das comunidades bacterianas da porção seca da mata foram os que mais se diferenciaram em função da sazonalidade da precipitação, apresentando similaridade de 53% entre as transições. Já os perfis da porção úmida do Monjolo apresentaram similaridade de 72% entre transições seca-chuva e chuva-seca (Figura 19).

O gradiente topográfico também foi um fator de agrupamento entre perfis e de diferenciação entre comunidades bacterianas na mata do Monjolo (Figuras 18 e 19). Na comparação entre estações seca e chuvosa, as comunidades de bactérias da porção seca da mata apresentaram 69 a 72% de similaridade com as comunidades da porção úmida. Já na comparação entre transições seca/chuvosa e chuvosa/seca as comunidades de bactérias da porção úmida da mata apresentaram 53 a 63% de similaridade com as comunidades bacterianas da porção seca (Figura 19). Outro aspecto interessante desse dendrograma foi o isolamento completo da comunidade seca na transição entre estações seca e chuvosa do restante da árvore hierárquica. Sua similaridade com os outros perfis foi de apenas 53%, o que pode indicar a presença de comunidades bacterianas bem distintas na porção seca da mata em um período de transição entre estações (Figura 19).



**Figura 18.** Dendrograma (UPGMA) dos perfis das comunidades bacterianas presentes nos solos da mata de galeria do Monjolo, em diferentes posições do gradiente topográfico (comunidade seca e comunidade úmida) e em diferentes períodos da sazonalidade de precipitação (estação seca e estação chuvosa), utilizando o coeficiente de similaridade de DICE.

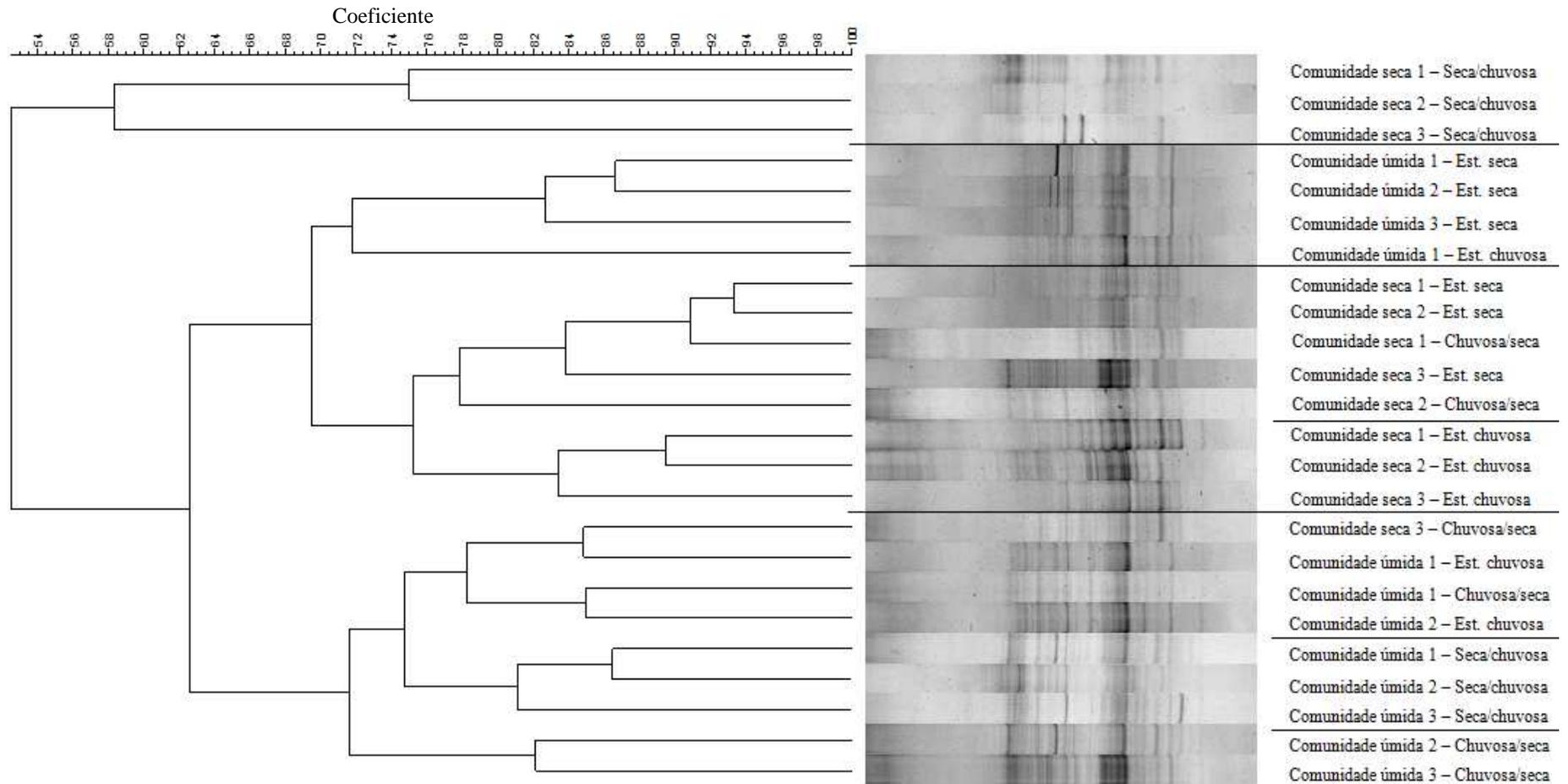


**Figura 19.** Dendrograma (UPGMA) dos perfis das comunidades bacterianas presentes nos solos da mata de galeria do Monjolo, em diferentes posições do gradiente topográfico (comunidade seca e comunidade úmida) e nas transições entre estação seca e estação chuvosa e entre estação chuvosa e estação seca, utilizando o coeficiente de similaridade de DICE.

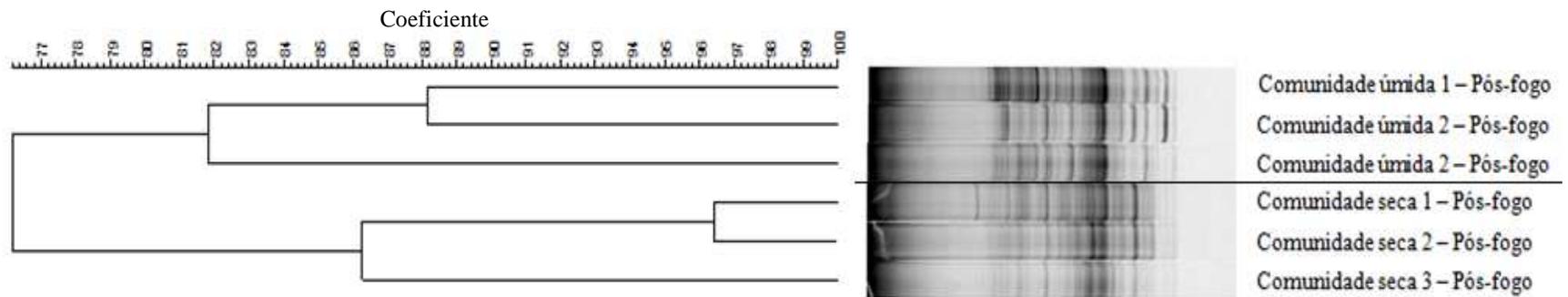
Ao comparar as amostras das estações seca, e chuvosa e transições em um único dendrograma (Figura 20), o padrão de diferenciação das comunidades bacterianas em função da sazonalidade de precipitação e do gradiente topográfico permaneceu, apresentando coeficientes de similaridade muito próximos aos observados nas figuras 15 e 16. No entanto, na comparação geral, a influência da topografia da mata foi mais marcante que o efeito da sazonalidade da precipitação (Figura 20). Foram observados alguns agrupamentos entre perfis provenientes de uma mesma porção do gradiente topográfico, mas de diferentes estações e/ou transições da sazonalidade de precipitação. Esse padrão foi mais perceptível para comunidades bacterianas da estação chuvosa e da transição chuva-seca, cujos perfis se agruparam aos de outras estações em função da posição no gradiente topográfico.

#### *Efeitos do incêndio acidental sobre a diversidade bacteriana*

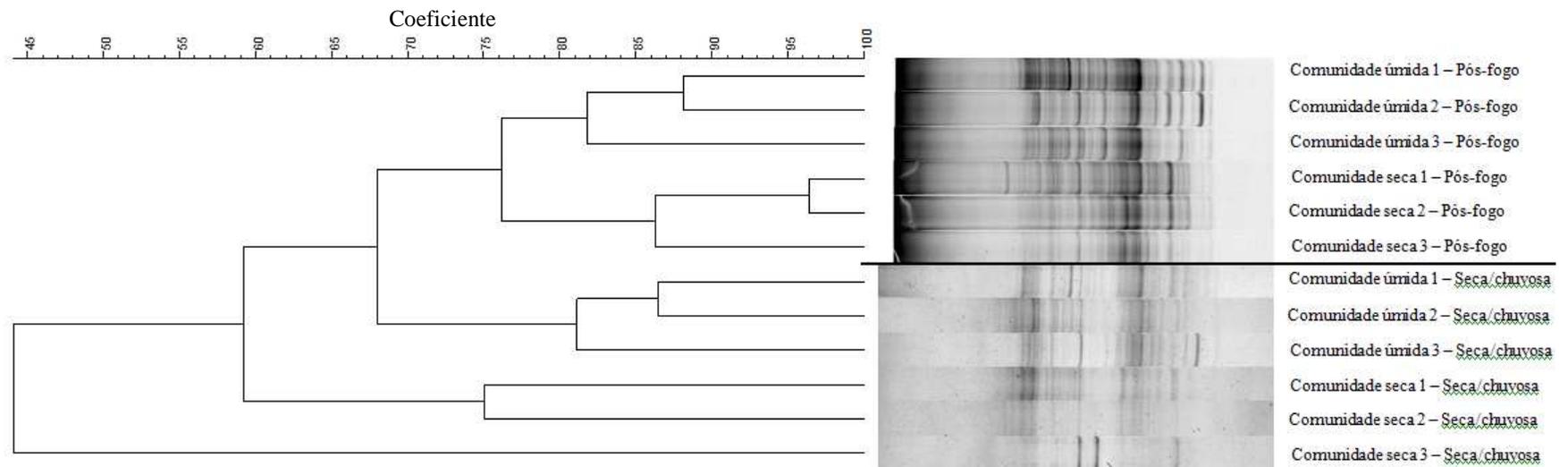
Após o incêndio acidental de setembro de 2011, o gradiente topográfico continuou sendo um fator de diferenciação das comunidades bacterianas da mata do Monjolo (Figura 21). No entanto, a comunidade de bactérias da porção seca apresentou 76% de similaridade com a comunidade bacteriana da porção úmida da mata, valor superior ao encontrado em qualquer outra época de coleta antes do incêndio (Figuras 18 e 19). Ao comparar os perfis do pós-fogo com aqueles da transição seca-chuva anterior ao incêndio acidental (Figura 22), observou-se total separação entre as duas épocas de coleta, havendo 68% de similaridade entre pós-fogo e a transição entre estações seca e chuvosa de 2010.



**Figura 20.** Dendrograma ilustrando a relação de similaridade (UPGMA com coeficiente de DICE) entre perfis das comunidades bacterianas presentes em solos da mata de galeria do Monjolo em duas posições do gradiente topográfico (comunidade seca e comunidade úmida) e em quatro períodos diferentes da sazonalidade de precipitações (estação seca, estação chuvosa, transição entre estações seca e chuvosa e transição entre estações chuvosa e seca).



**Figura 21.** Dendrograma ilustrando a relação de similaridade (UPGMA com coeficiente de DICE) entre perfis das comunidades bacterianas presentes em solos da mata de galeria do Monjolo em duas posições do gradiente topográfico (comunidade seca e comunidade úmida) duas semanas após queimada acidental ocorrida em setembro de 2011.



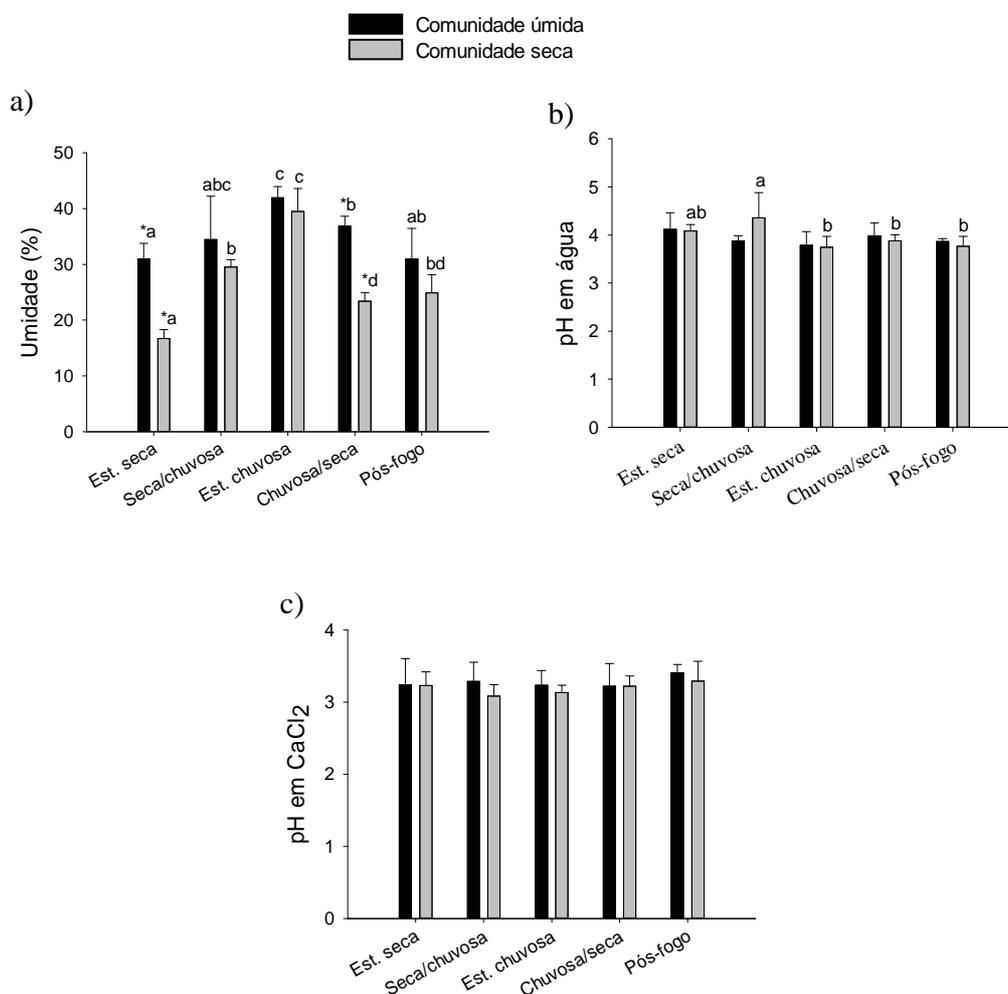
**Figura 22.** Dendrograma ilustrando a relação de similaridade (UPGMA com coeficiente de DICE) entre perfis das comunidades bacterianas presentes em solos da mata de galeria do Monjolo em duas posições do gradiente topográfico (comunidade seca e comunidade úmida) e na transição entre estações seca e chuvosa de 2010 e de 2011, sendo que no segundo ano as coletas de solo foram realizadas duas semanas após queimada acidental ocorrida na mata.

### III) Taquara

#### *Variáveis de solo*

A diferenciação entre comunidades bacterianas de acordo com as estações ou com a posição no gradiente topográfico pode ser observada também em alguns parâmetros físico-químicos dos solos coletados. O teor de umidade do solo na mata do Taquara, por exemplo, apresentou variação tanto em função da sazonalidade de precipitação como do gradiente topográfico. A porção úmida da mata apresentou teor de umidade do solo de 31 % na estação seca, 34 % na transição seca/chuva, 42 % na estação chuvosa, 37 % na transição chuva/seca e 31 % após a queimada de 2011. Na comunidade seca, a umidade no solo foi 17 % na estação seca, 30 % na transição seca/chuva, 40 % na estação chuvosa, 23 % na transição chuva/seca e 25 % no pós-fogo (Figura 23-a). Com isso, na comunidade seca da mata, as amostras de diferentes estações e as do período pós-fogo apresentaram diferenças significativas quanto ao teor gravimétrico de água do solo, enquanto na comunidade úmida foram registradas diferenças significativas apenas entre as estações seca e chuvosa. Os teores de umidade registrados após o incêndio acidental não apresentaram diferenças significativas em relação às transições estacionais, mas diferiram dos registrados no auge das estações seca e chuvosa. O efeito do gradiente topográfico sobre a umidade do solo foi observado apenas na estação seca e na transição chuva/seca (Figura 23-a).

Os valores de pH do solo medido em água variaram entre 3,8 e 4,4. Os valores de pH em amostras da transição seca-chuva a porção seca da mata foram significativamente superiores em comparação com aqueles de amostras da estação chuvosa, da transição chuva-seca e do período pós-fogo (Figura 23-b). Já o pH medido em  $\text{CaCl}_2$  variou entre 3,1 e 3,4, não havendo variação significativa em função da sazonalidade ou do gradiente topográfico (Figura 23-c).



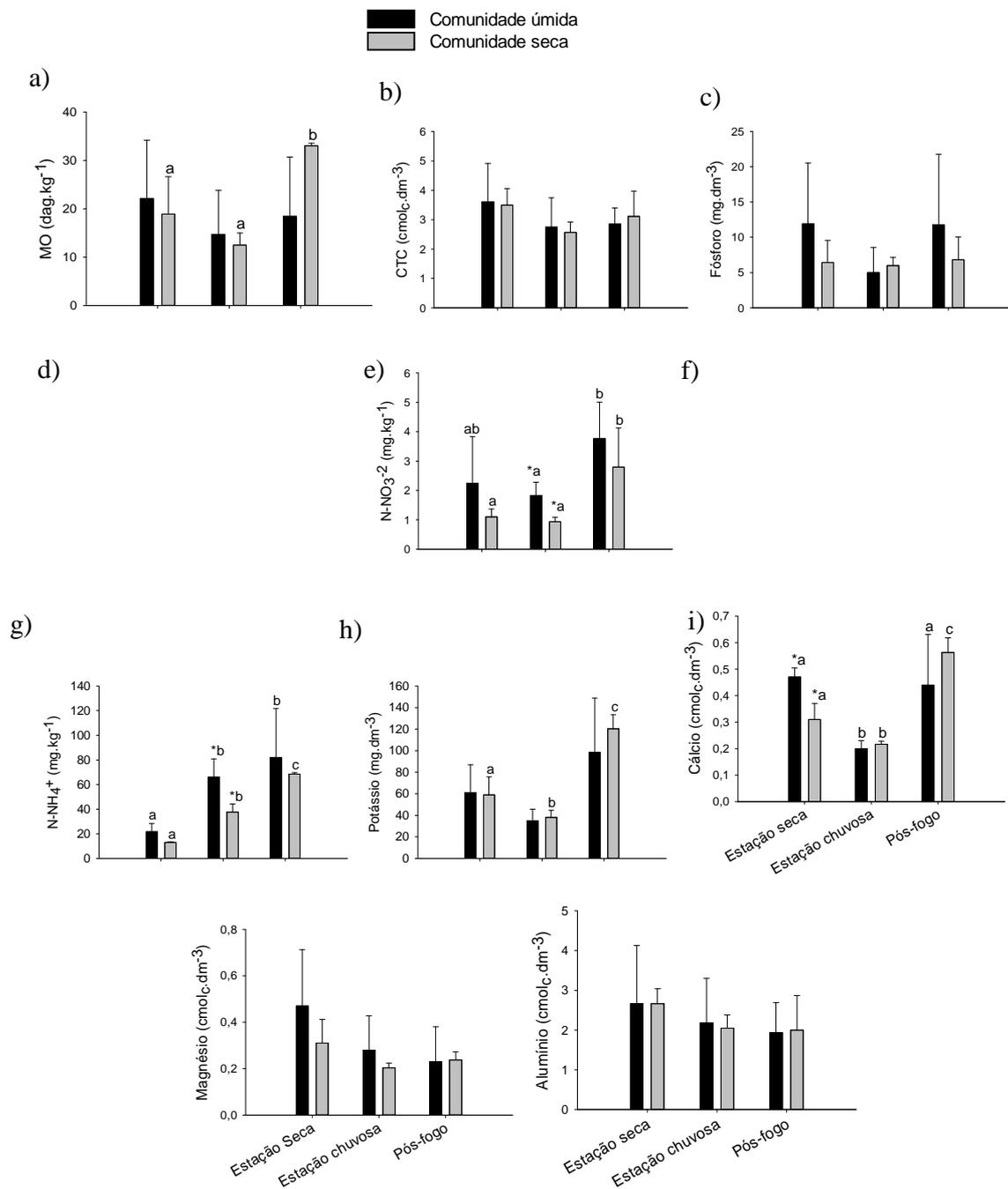
**Figura 23.** Valores médios do (a) teor de umidade (%) e (b) pH em água e (c) em CaCl<sub>2</sub> das amostras de solo (0-10 cm de profundidade) coletadas nas comunidades úmida e seca da mata de galeria do córrego Taquara nas estações seca e chuvosa e transição entre elas (agosto/2010 a maio/2011) e após queimada ocorrida em setembro/2011. As barras verticais representam os desvios padrão, os asteriscos indicam diferenças significativas entre comunidades úmida e seca no mesmo período amostral ( $p < 0,05$ ) e as letras indicam diferenças significativas entre as estações e transições climáticas dentro da mesma posição no gradiente topográfico ( $p < 0,05$ ).

Na mata do Taquara, a concentração de MO presente no solo variou entre 14,7 e 22,1  $\text{dag.kg}^{-1}$  na porção úmida do gradiente topográfico e entre 12,5 e 33,0  $\text{dag.kg}^{-1}$  na porção seca. A comunidade seca da mata após incêndio acidental apresentou concentração de MO significativamente superior às registradas nas estações seca e chuvosa. Não houve diferenças significativas em função do gradiente topográfico ou da sazonalidade de precipitação para a comunidade úmida da mata (Figura 24-a). De forma semelhante, os valores de CTC, que variaram entre 2,6 e 3,6  $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$ , não diferiram significativamente entre estações ou em função do gradiente topográfico durante o período de estudo (Figura 24-b).

Na comunidade seca da mata do Taquara, as concentrações de potássio e cálcio foram significativamente superiores após o incêndio. Ainda na comunidade seca da mata, as menores concentrações de potássio (38  $\text{mg}.\text{dm}^{-3}$ ) foram determinadas na estação chuvosa, seguido pela estação seca (59  $\text{mg}.\text{dm}^{-3}$ ). Já no período pós-fogo, a concentração de potássio dobrou em relação ao valor da estação seca (120  $\text{mg}.\text{dm}^{-3}$ ) (Figura 24-f). Quanto às concentrações de cálcio, que variaram entre 0,2 e 0,6  $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$ , os menores valores também foram determinados em amostras da estação chuvosa. O efeito do gradiente topográfico foi observado apenas na estação seca, onde a porção úmida da mata apresentou concentração de cálcio significativamente superior à porção seca (Figura 24-g).

As concentrações de magnésio e alumínio não variaram significativamente em função da sazonalidade de precipitação ou do gradiente topográfico. As concentrações de magnésio nas matas variaram entre 0,2  $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$  e 0,5  $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$  (Figura 24-h), enquanto as de alumínio ficaram no intervalo entre 2,0  $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$  e 2,7  $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$  (Figura 24-i).

As concentrações de fósforo disponível variaram entre 5,0 e 12,0  $\text{mg}.\text{dm}^{-3}$ , e não houve efeito significativo da sazonalidade de precipitação ou do gradiente topográfico sobre tal variação (Figura 24-c). Já a concentração de  $\text{N-NO}_3^-$  no solo variou entre 0,9 e 3,8  $\text{mg}.\text{kg}^{-1}$ , sendo que no pós fogo foram registradas as maiores concentrações. Na estação chuvosa, houve efeito do gradiente topográfico, com o solo da comunidade úmida apresentando aproximadamente o dobro da concentração de N-nítrico registrada na comunidade seca (Figura 24-d).



**Figura 24.** Valores médios de (a) matéria orgânica (MO) (dag.kg<sup>-1</sup>), (b) capacidade de troca catiônica (CTC) (cmol<sub>c</sub>.dm<sup>-3</sup>), (c) fósforo (mg.dm<sup>-3</sup>), (d) potássio (mg.dm<sup>-3</sup>), (e) N-nítrico (mg.kg<sup>-1</sup>), (f) N-amoniacal (mg.kg<sup>-1</sup>), (g) cálcio (cmol<sub>c</sub>.dm<sup>-3</sup>), (h) magnésio (cmol<sub>c</sub>.dm<sup>-3</sup>) e (i)

alumínio ( $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$ ) no solo (0-10 cm de profundidade) das comunidades úmida e seca da mata de galeria do córrego Taquara, nas estações seca e chuvosa, e após queimada ocorrida em setembro/2011. As barras verticais representam os desvios padrão, os asteriscos indicam diferenças significativas entre as comunidades úmida e seca dentro de um mesmo período amostral ( $p < 0,05$ ) e as letras indicam diferenças significativas entre as estações e pós-fogo dentro da mesma posição no gradiente topográfico ( $p < 0,05$ ).

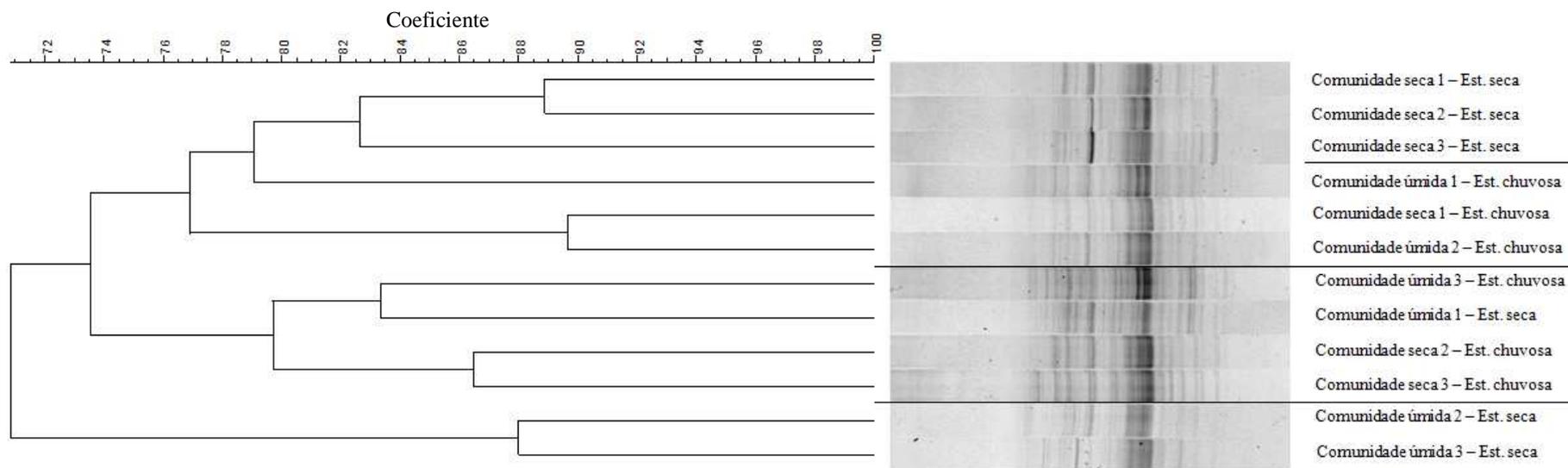
A concentração média de  $\text{N-NH}_4^+$  variou entre  $21,6 \text{ mg.kg}^{-1}$  e  $82,0 \text{ mg.kg}^{-1}$  e as menores concentrações foram observadas na estação seca. Na comunidade úmida, a concentração de  $\text{N-NH}_4^+$  foi de três a quatro vezes superior na estação chuvosa e no pós-fogo quando comparada à estação seca (Figura 24-e). Na comunidade seca, a concentração de  $\text{N-NH}_4^+$  na estação chuvosa foi o dobro da estação seca, mas as maiores concentrações foram determinadas no período pós-fogo. O efeito do gradiente topográfico foi observado apenas na estação chuvosa, onde o solo da comunidade úmida apresentou maior concentração média de  $\text{N-NH}_4^+$  que o solo da comunidade seca (Figura 24-e).

#### *Variações sazonais e espaciais da diversidade bacteriana*

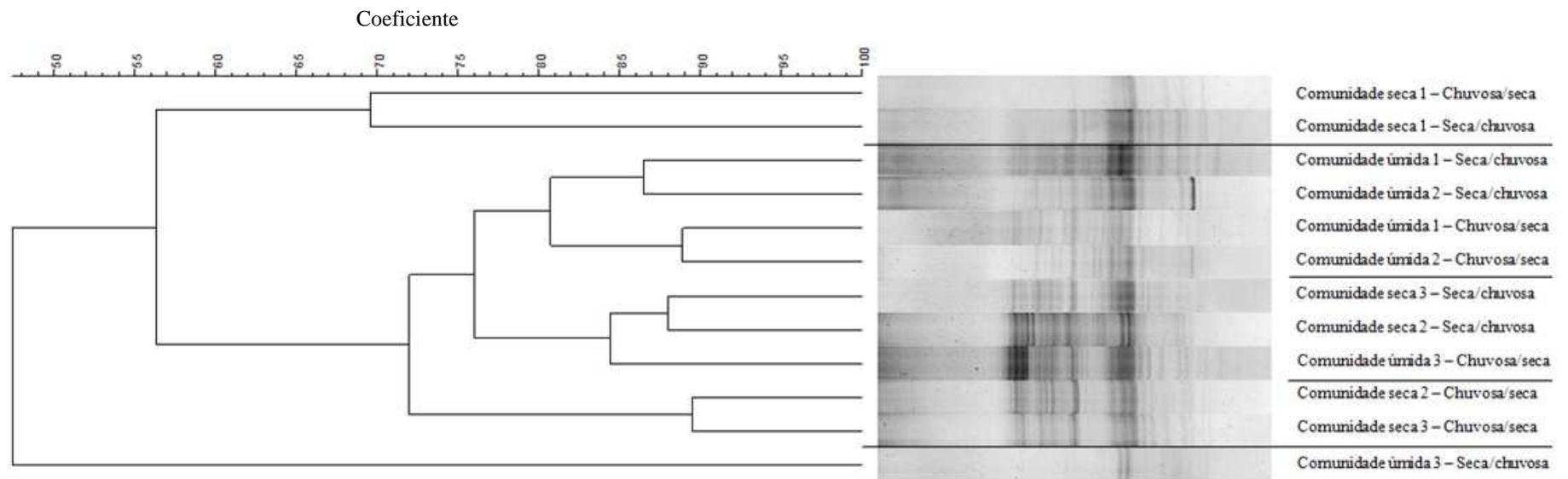
Na mata do Taquara, os perfis das comunidades bacterianas apresentaram padrões de agrupamento similares aos observados na mata do Monjolo. Foi possível observar padrões de similaridade entre comunidades de bactérias regidos tanto pela sazonalidade da precipitação como pelo gradiente topográfico.

Na comparação entre comunidades bacterianas coletadas na estação seca e na estação chuvosa observou-se claro efeito da sazonalidade da precipitação, sendo a topografia um fator secundário e com maior influência na estação seca. A similaridade entre perfis da estação seca e da estação chuvosa variou entre 72 e 79%. No período da estação seca, as comunidades bacterianas das duas porções do gradiente topográfico apresentaram similaridade de 72%. Na estação chuvosa, a influência do gradiente topográfico foi menos marcante, com agrupamentos heterogêneos de perfis provenientes tanto da porção úmida da mata como da porção seca, onde os índices de similaridade variaram entre 74% e 90% (Figura 25).

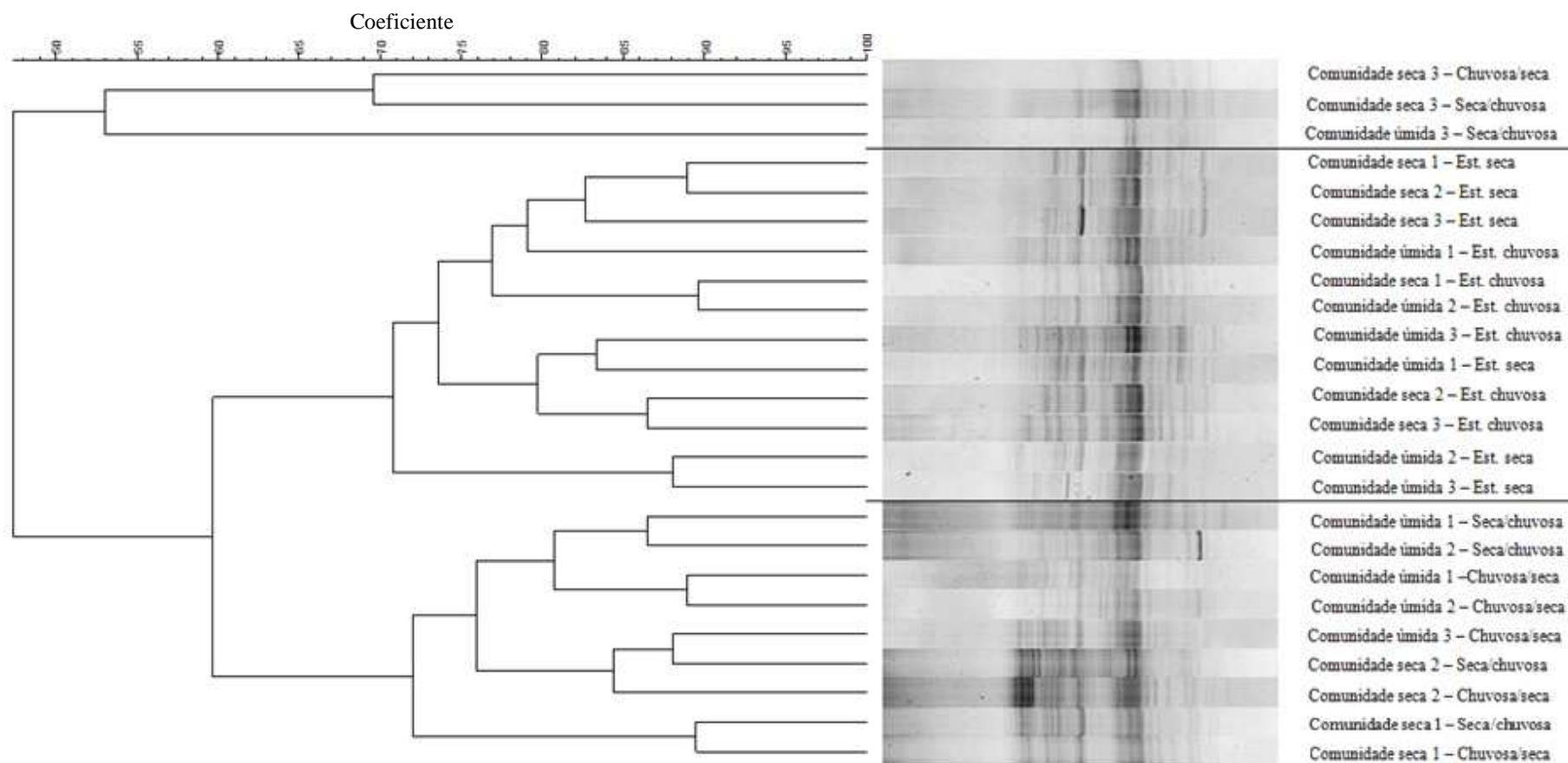
Na comparação entre transições estacionais (Figura 26), observou-se maior efeito do gradiente topográfico sobre as comunidades bacterianas, sendo o período de coleta um fator secundário no agrupamento entre perfis. O dendrograma evidenciou ainda maior similaridade entre perfis da comunidade úmida em ambas as transições entre estações, enquanto os perfis da comunidade seca apresentaram menor agrupamento e, concomitantemente, menores índices de similaridade ao longo da árvore hierárquica (Figura 26).



**Figura 25.** Dendrograma (UPGMA) dos perfis das comunidades bacterianas presentes nos solos da mata de galeria do Taquara, em diferentes posições do gradiente topográfico (comunidade seca e comunidade úmida) e em diferentes períodos da sazonalidade de precipitação (estação seca e estação chuvosa), utilizando o coeficiente de similaridade de DICE.



**Figura 26.** Dendrograma (UPGMA) dos perfis das comunidades bacterianas presentes nos solos da mata de galeria do Taquara, em diferentes posições do gradiente topográfico (comunidade seca e comunidade úmida) e nas transições entre estação seca e estação chuvosa e entre estação chuvosa e estação seca, utilizando o coeficiente de similaridade de DICE.

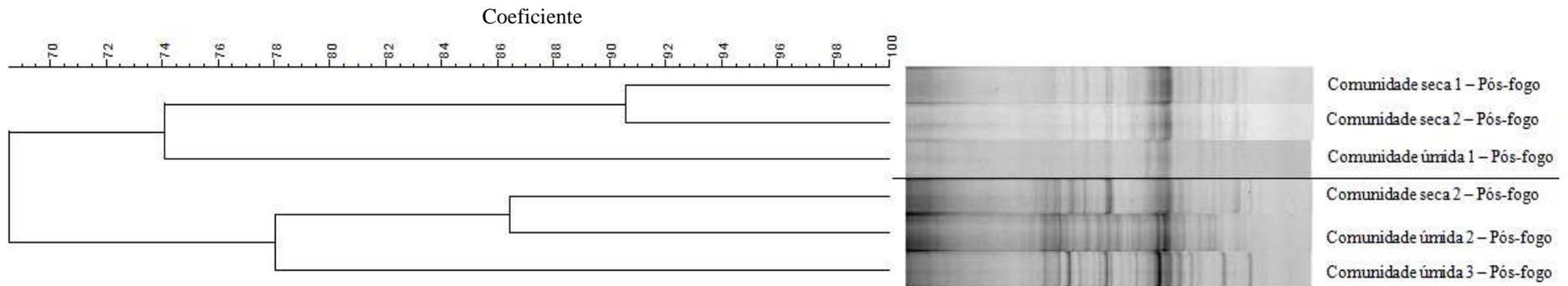


**Figura 27.** Dendrograma ilustrando a relação de similaridade (UPGMA com coeficiente de DICE) entre perfis das comunidades bacterianas presentes em solos da mata de galeria do Taquara em duas posições do gradiente topográfico (comunidade seca e comunidade úmida) e em quatro períodos diferentes da sazonalidade de precipitações (estação seca, estação chuvosa, transição entre estações seca e chuvosa e transição entre estações chuvosa e seca).

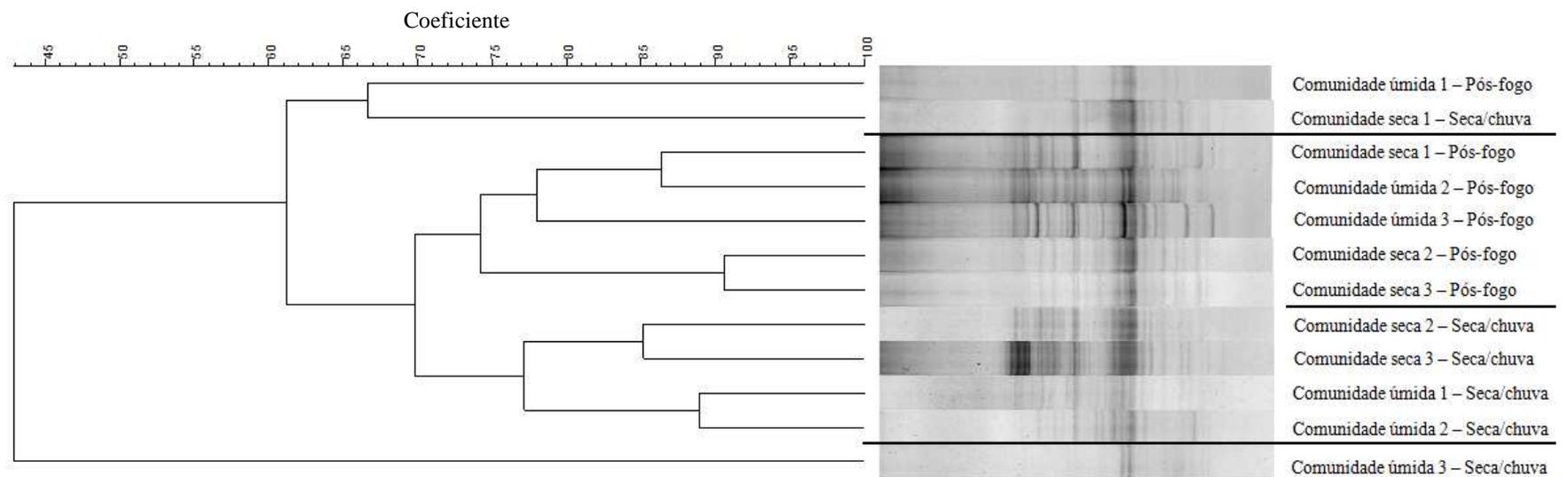
Ao serem comparados os perfis bacterianos provenientes das estações seca, chuvosa e das transições tem-se uma nítida separação das estações seca e chuvosa em relação às transições estacionais (Figura 27). No dendrograma, as comunidades bacterianas das estações seca e chuvosa se agruparam, ocorrendo o mesmo com as provenientes das transições, acarretando em um índice de similaridade de 47 a 60% entre esses dois grandes grupos. Dessa forma, é possível perceber uma identidade própria das comunidades bacterianas nas transições entre estações, distinta daquela encontrada em cada extremo da sazonalidade de precipitação (Figura 27).

#### *Efeitos do incêndio acidental sobre a diversidade bacteriana*

Na comparação entre comunidades bacterianas presentes no solo duas semanas após incêndio acidental, observou-se um efeito parcial do gradiente topográfico sobre os perfis de diversidade (Figura 28). Há um maior agrupamento entre comunidades de bactérias da porção seca da mata, que apresentaram de 69 a 90% de similaridade entre si, enquanto os perfis da comunidade úmida apresentaram similaridade que variou entre 69 e 79 %. Ao analisar a similaridade entre as comunidades bacterianas após o incêndio com os perfis da transição entre estações seca e chuvosa de 2010, o dendrograma resultante indicou diferenciação entre as comunidades dessas duas épocas, que apresentaram uma similaridade de 70%, formando grupos distintos na árvore hierárquica (Figura 29).



**Figura 28.** Dendrograma ilustrando a relação de similaridade (UPGMA com coeficiente de DICE) entre perfis das comunidades bacterianas presentes em solos da mata de galeria do Taquara em duas posições do gradiente topográfico (comunidade seca e comunidade úmida) duas semanas após queimada acidental ocorrida em setembro de 2011.



**Figura 29.** Dendrograma ilustrando a relação de similaridade (UPGMA com coeficiente de DICE) entre perfis das comunidades bacterianas presentes em solos da mata de galeria do Taquara em duas posições do gradiente topográfico (comunidade seca e comunidade úmida) e na transição entre estações seca e chuvosa de 2010 e de 2011, sendo que no segundo ano as coletas de solo foram realizadas duas semanas após queimada acidental ocorrida na mata.

#### **IV) Variáveis de solo nas três matas de galeria**

As análises de PCA (*principal component analysis*) com os parâmetros físico-químicos avaliados (umidade, pH, MO, CTC, Ca, Mg, Al, K, P, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) indicaram significância estatística de seus eixos, mas não indicaram tendências de agrupamento das parcelas amostrais em função de variáveis de solo. Adicionalmente, a distribuição das parcelas amostrais no diagrama de ordenação foi independente da mata a que pertenciam ou da posição no gradiente topográfico onde se localizavam dentro de cada mata.

Apesar desse resultado, diferenças significativas em função da sazonalidade da precipitação, do gradiente topográfico e do incêndio acidental foram observadas em diversos parâmetros de solo mensurados nas três matas de galeria, como já relatado anteriormente. A tabela 4 apresenta uma síntese das variações significativas observadas.

**Tabela 4.** Variações estatisticamente significativas de parâmetros do solo das matas do Pitoco, Monjolo e Taquara em função da sazonalidade da precipitação, gradiente topográfico e período pós-fogo. ns: não significativo; sg: significativo ( $p < 0,05$ ).

Mata de Galeria	Variáveis de solo	Sazonalidade	Gradiente Topográfico	Pós-fogo
<b>Pitoco</b>	Umidade	sg	sg	ns
	pH (H <sub>2</sub> O)	sg	ns	ns
	pH (CaCl <sub>2</sub> )	ns	ns	sg
	MO	ns	ns	ns
	CTC	ns	ns	ns
	Ca	ns	sg	sg
	Mg	ns	ns	ns
	Al	ns	ns	ns
	K	ns	sg	sg
	P	sg	ns	sg
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	ns	ns	sg
	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	sg	ns	sg
	<b>Monjolo</b>	Umidade	sg	ns
pH (H <sub>2</sub> O)		sg	ns	ns
pH (CaCl <sub>2</sub> )		ns	ns	sg
MO		ns	sg	ns
CTC		ns	sg	ns
Ca		ns	sg	ns
Mg		ns	ns	ns
Al		ns	ns	sg
K		ns	ns	sg
P		ns	ns	sg
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		ns	ns	sg
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		sg	ns	sg
<b>Taquara</b>		Umidade	sg	sg
	pH (H <sub>2</sub> O)	ns	ns	ns
	pH (CaCl <sub>2</sub> )	sg	ns	ns
	MO	ns	ns	sg
	CTC	ns	ns	ns
	Ca	sg	sg	sg
	Mg	ns	ns	ns
	Al	ns	ns	ns
	K	sg	ns	sg
	P	ns	ns	ns
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	ns	sg	sg
	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	sg	sg	sg

### 7.1.3 Sequenciamento

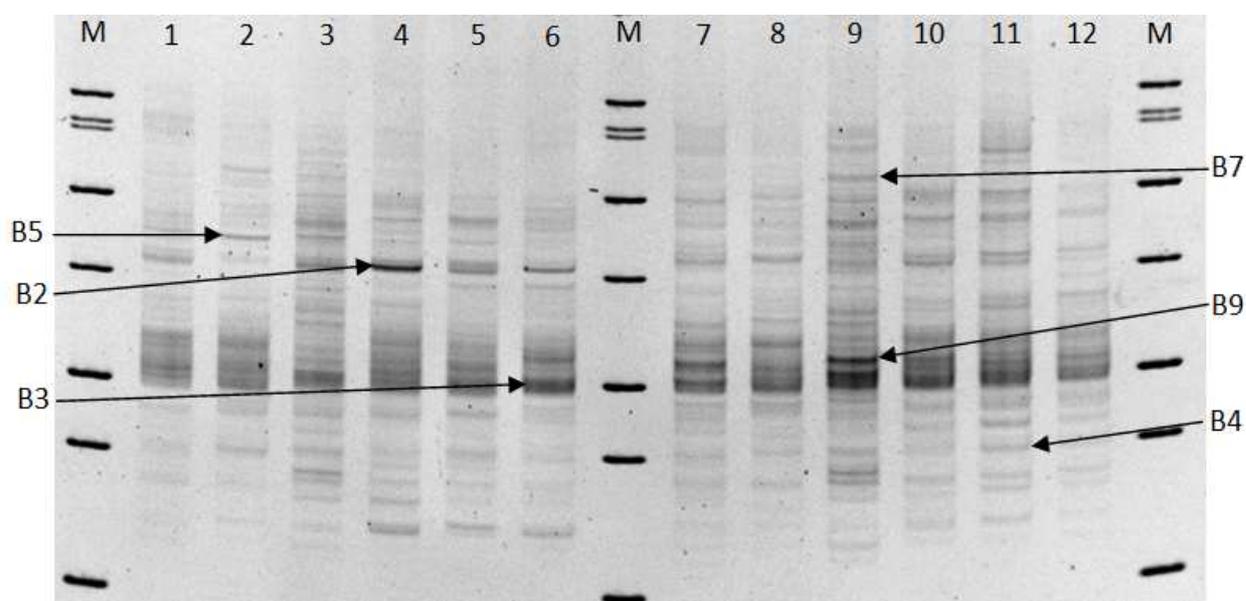
Com o intuito de conhecer as populações mais dominantes da comunidade e as mais afetadas pelas variações sazonais e espaciais das matas de galeria, foram selecionadas algumas bandas dos géis de RISA para sequenciamento (Figuras 30, 31 e 32). Todas as bandas escolhidas apresentavam intensidade tal que permitisse boa visualização no momento do corte. Após essa primeira triagem, o critério utilizado para escolha das bandas foi a análise de presença/ausência, seguido pela intensidade da banda, o que pode indicar abundância de organismos (Tabela 5).

A maioria das bandas cortadas foi amplificada novamente com sucesso. Porém houve necessidade de duas ampliações com as mesmas condições para obtenção de produto com quantidade suficiente de DNA para sequenciamento (150 ng em 4 µL). Após as ampliações, cerca de metade das amostras aplicadas no gel de agarose 1% apresentavam mais de uma banda. Aquelas que apresentavam banda única foram diretamente purificadas a partir do produto de PCR. Já as amostras que ainda apresentavam bandas inespecíficas foram cortadas do gel de agarose e eluídas, para serem purificadas em seguida. Uma alíquota do DNA purificado foi aplicado em novo gel de agarose 1% para confirmação da presença de banda única.

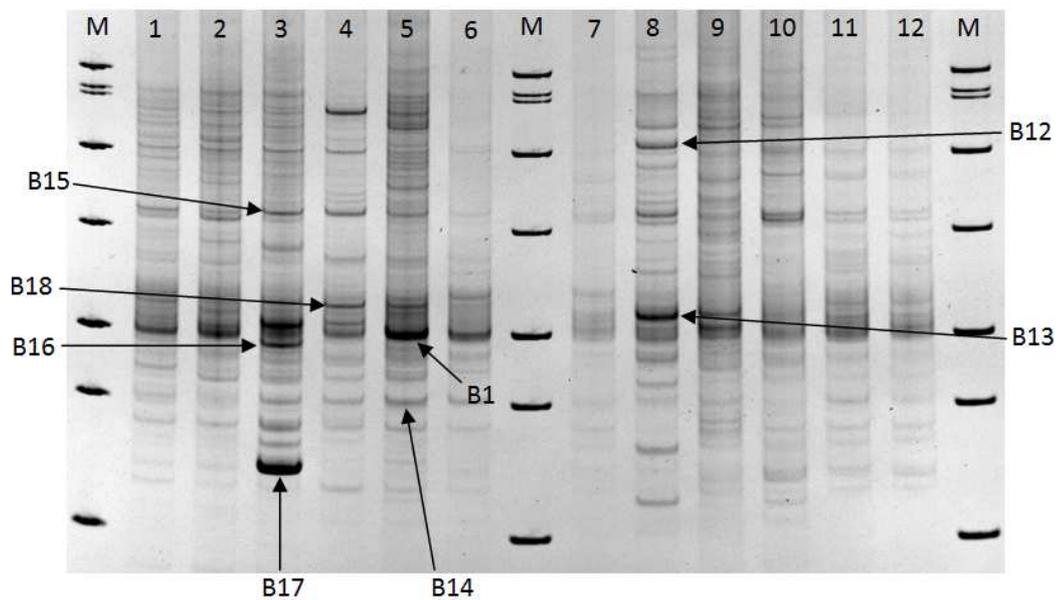
Foram realizadas duas tentativas de sequenciamento. Na primeira tentativa, apenas metade das bandas foram sequenciadas. Após análise do resultado obtido com a busca no BLAST foi verificado que algumas amostras não apresentaram sequências confiáveis. Uma nova reação de sequenciamento foi realizada utilizando maior quantidade de *template* na reação. As sequências apresentaram tamanhos que variaram entre 97 e 630 pb e encontram-se em anexo.

Os resultados obtidos após busca no NCBI-BLAST estão apresentados na tabela 5. A identidade do organismo mais similar à sequência analisada identificado no BLAST variou entre 82 e 98%. A maioria das bandas únicas ou de maior intensidade escolhidas foram provenientes de perfis da comunidade úmida das matas e/ou do período pós-fogo. Das 18 sequências de qualidade resultantes dos sequenciamentos, 11 foram identificadas como pertencentes ao filo Actinobacteria, cinco foram identificadas como Proteobacteria, uma como

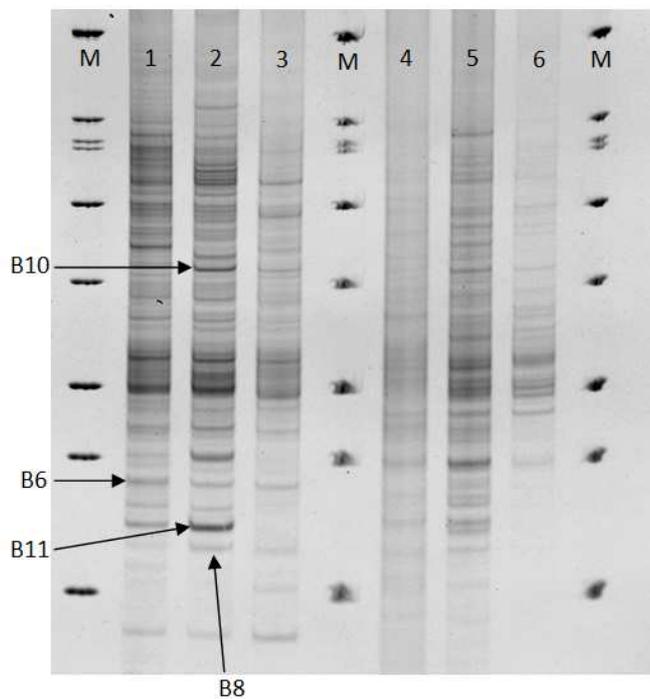
pertencente ao filo Acidobacteria, uma como Gemmatimonadetes e uma como bactéria não-cultivável, podendo se referir a uma espécie ainda não conhecida. Todas as bandas escolhidas por estarem presentes nos perfis das três matas foram identificadas como pertencentes ao filo Actinobacteria. Dentre aquelas que variaram em intensidade ou em presença/ausência entre comunidades do gradiente topográfico, identificou-se os filios Actinobacteria, Proteobacteria e Gemmatimonadetes, cujo único representante foi proveniente da comunidade úmida da mata do Taquara. No período pós-fogo, foram identificados os filios Actinobacteria, com o gênero *Kitasatospora*, Proteobacteria e Acidobacteria, cujo único representante era originário da comunidade úmida da mata do Pitoco.



**Figura 30.** RISA das amostras de solo coletadas na mata do Taquara nas estações seca (1 – 6) e chuvosa (7 – 12). As letras e números junto às setas indicam as posições das bandas selecionadas para sequenciamento. Da esquerda para a direita: M – marcador 1 kb ladder; 1-3 – Comunidade úmida; 4-6 – Comunidade seca; 7-9 – Comunidade úmida; 10-12 – Comunidade seca.



**Figura 31.** RISA das amostras de solo coletadas nas Matas do Pitoco (1-6) e do Taquara (7-12) após queimada ocorrida em setembro/2011. As letras e números junto às setas indicam as posições das bandas selecionadas para sequenciamento. Da esquerda para a direita: M – marcador 1 kb ladder; 1-3 – Comunidade úmida (Pitoco); 4-6 – Comunidade seca (Pitoco); 7-9 – Comunidade úmida (Taquara); 10-12 – Comunidade seca (Taquara).



**Figura 32.** RISA das amostras de solo coletadas na Mata do Monjolo após queimada ocorrida em setembro/2011. As letras e números junto às setas indicam as posições das bandas selecionadas para sequenciamento. Da esquerda para a direita: M – marcador 1 kb ladder; 1-3 – Comunidade úmida; 4-6 – Comunidade seca.

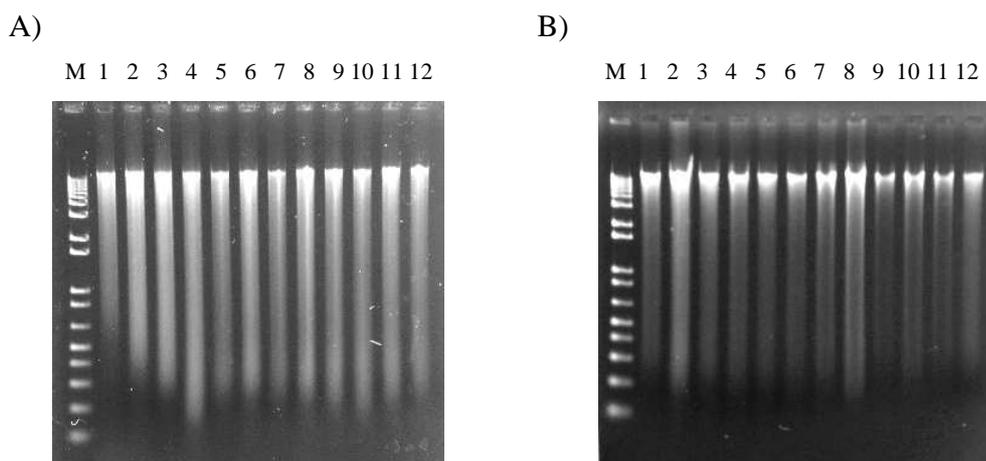
**Tabela 5.** Justificativa da escolha da banda, sequenciamento das bandas retiradas dos géis de RISA 16S-23S das matas de galeria do Pitoco, Monjolo e Taquara, identidade com banco de dados BLAST, e-value e número de acesso no GenBank do organismo de maior identidade com a sequência.

Justificativa de escolha	Banda	Identificação da sequência mais similar	Identidade BLAST	E-value	Número de acesso
<b>1. Presença em todos os perfis</b>					
Alta intensidade e nitidez da banda	B1	<i>Streptomyces</i> (Actinobacteria)	82%	6e-55	FJ551631
Alta intensidade e nitidez da banda	B2	Actinobacteria	98%	3e-43	EU193006
Nitidez da banda	B3	<i>Acidothermus</i> (Actinobacteria)	98%	9e-52	HQ212445
Nitidez da banda	B4	Acidimicrobineae (Actinobacteria)	97%	1e-41	HQ213446
Nitidez da banda	B5	<i>Acidimicrobium</i> (Actinobacteria)	97%	1e-59	FJ552356
<b>2. Variação entre perfis</b>					
Maior intensidade em perfis da comunidade úmida	B6	<i>Variovorax paradoxus</i> (Proteobacteria)	88%	2e-06	CP001636
Presença na comunidade úmida do Taquara	B7	Acidimicrobineae (Actinobacteria)	97%	1e-46	HQ213446
Maior intensidade e nitidez na comunidade úmida das matas	B8	Gammaproteobacteria (Proteobacteria)	90%	3e-67	FN667741
Alta intensidade na comunidade úmida do Taquara	B9	Acidimicrobineae (Actinobacteria)	98%	4e-39	HQ213446
Presença nos perfis do Monjolo e alta intensidade da banda	B10	Proteobacteria	96%	6e-30	AY713463
Alta intensidade na comunidade úmida do Taquara	B11	<i>Gemmatimonas</i> (Gemmatimonadetes)	90%	1e-85	FJ551446
<b>3. Bandas no período pós-fogo</b>					
Intensidade e nitidez da banda	B12	Betaproteobacteria (Proteobacteria)	98%	3e-23	AP011643
Alta intensidade na comunidade úmida do Monjolo	B13	<i>Kitasatospora</i> (Actinobacteria)	93%	7e-81	AP010968
Intensidade e nitidez no Pitoco e Monjolo	B14	Bactéria não-cultivável	97%	7e-26	AP011643
Boa nitidez e intensidade nas matas do Pitoco e Taquara	B15	Proteobacteria	91%	3e-92	AY713463
Presença apenas na comunidade úmida do Pitoco	B16	<i>Kitasatospora</i> (Actinobacteria)	94%	1e-84	AP010968
Alta intensidade na comunidade úmida do Pitoco	B17	<i>Kitasatospora</i> (Actinobacteria)	95%	5e-88	AP010968
Presença em perfis do Pitoco	B18	<i>Solibacter usitatus</i> (Acidobacteria)	82%	3e-17	CP000473

## 7.2 Efeito de curto prazo da adição de água, nitrogênio e fósforo sobre as comunidades bacterianas do solo

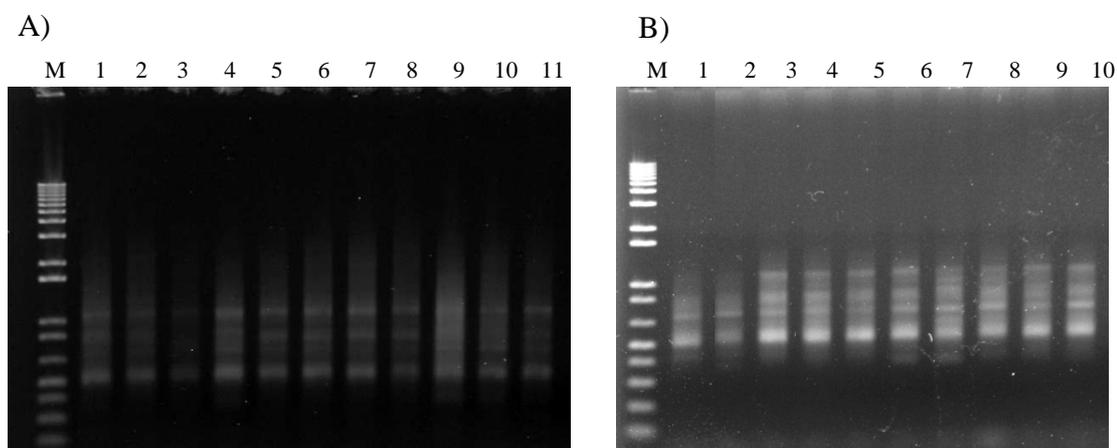
### 7.2.1 Extração de DNA e PCR

A quantidade média de DNA extraído do solo das subparcelas do experimento nos diferentes tempos de coleta foi 20 ng/μl (Figura 33). Devido a grandes concentrações de matéria orgânica, o DNA extraído não se encontrava em condições ideais para uma aplicação direta nas reações de PCR, provavelmente em decorrência da interferência de ácidos húmicos nas reações enzimáticas de amplificação. Um passo adicional de diluição do DNA extraído em água milli-Q (1/10 a 1/200) foi realizado para que se atenuasse a interferência negativa desses compostos.



**Figura 33.** Géis de agarose 1%. Extração de DNA. A) amostras coletadas antes da adição de água e nutrientes; B) amostras coletadas uma hora após adição de água e nutrientes. Da esquerda para a direita: **M** – marcador 1 kb ladder; **1,5,9** – amostras adição de água; **2,6,10** – amostras adição de água + NH<sub>4</sub><sup>+</sup>; **3,7,11** – amostras adição de água + PO<sub>4</sub><sup>-</sup>; **4,8,12** – amostras adição de água + NH<sub>4</sub><sup>+</sup> + PO<sub>4</sub><sup>-</sup>.

Em decorrência da qualidade do DNA extraído e da necessidade do passo adicional de diluição, a amplificação por PCR com os primers L1R e 1406F teve de ser repetida várias vezes a fim de se chegar a um resultado satisfatório, em que qualidade e quantidade dos DNAs amplificados fossem suficientes para serem, posteriormente, submetidos à análise em gel de poliacrilamida. Na figura 34, são apresentados géis de agarose 1% com amostras de DNA amplificados por PCR, cuja qualidade e quantidade foram consideradas satisfatórias para aplicação em gel de RISA.



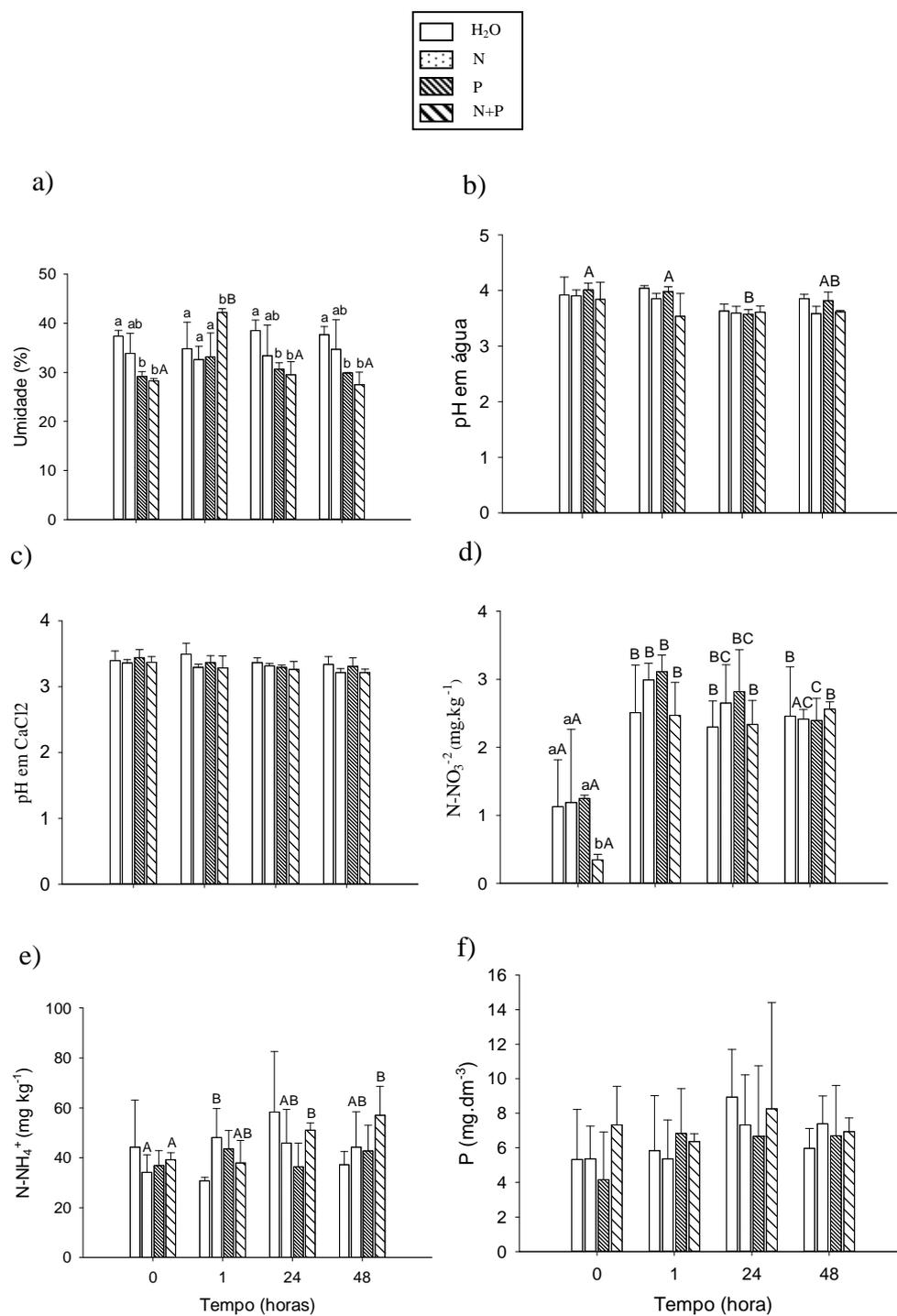
**Figura 34.** Géis de agarose 1%. Produtos de amplificação por PCR com primers L1R e 1406F de amostras de solo coletadas no experimento desenvolvido na porção úmida da mata do Pitoco. A) amostras coletadas 24 horas após adição de água e nutrientes, e B) amostras coletadas 48 horas após adição de água e nutrientes. Da esquerda para a direita: **M** – marcador 1 kb ladder; **1,5,9** – amostras adição de água; **2,6,10** – amostras adição de água +  $\text{NH}_4^+$ ; **3,7,11** – amostras adição de água +  $\text{PO}_4^-$ ; **4,8** – amostras adição de água +  $\text{NH}_4^+$  +  $\text{PO}_4^-$ .

### 7.2.2 Variáveis de solo

Os parâmetros de solo mensurados no decorrer do experimento apontaram algumas alterações entre os tempos amostrais e entre os tratamentos. O teor de umidade do solo, que variou entre 27% e 43%, não apresentou grandes alterações após adição de água e/ou nutrientes no solo. As subparcelas onde foram adicionados água + amônio + fósforo foram as únicas que apresentaram valores de umidade significativamente superiores uma hora após a adição, tendo apresentado também teor de umidade significativamente maior que as outras subparcelas nesse tempo amostral. Após 24 horas e 48 horas da aplicação dos tratamentos, os valores de umidade encontrados foram equivalentes aos observados antes da adição de água e nutrientes (Figura 35-a). Valores de pH em água apresentaram diferenças significativas apenas no tratamento água + fósforo 24 horas após adição do tratamento (Figura 35-b), enquanto para pH em  $\text{CaCl}_2$ , não houve variação significativa dos valores mensurados (Figura 35-c).

A concentração de fósforo, que variou entre  $4,2 \text{ mg.dm}^{-3}$  e  $8,9 \text{ mg.dm}^{-3}$  e não houve diferença significativa entre tratamentos ou entre tempos amostrais (Figura 35-f). Os parâmetros que apresentaram maior alteração no decorrer do experimento foram as concentrações de N-nítrico, que variou entre 0,3 e  $2,8 \text{ mg.kg}^{-1}$  e de N-amoniaco, que variou entre 30,7 e  $58,3 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Após uma hora da adição de água e nutrientes houve significativo aumento da concentração de N-nítrico no solo das subparcelas, independente do tratamento aplicado, mantendo-se dessa forma até 24 horas após estabelecimento do experimento. As concentrações de N-nítrico voltaram a diminuir só depois de 48 horas da aplicação dos tratamentos. Nesse tempo amostral, houve diminuição significativa do nutriente nas subparcelas com tratamento água + amônio, que apresentou valores de N-nítrico equivalentes aos encontrados antes da aplicação do tratamento (Figura 35-d).

Quanto às concentrações de N-amoniaco, apenas os tratamentos água + amônio e água + amônio + fósforo apresentaram diferenças significativas entre os tempos amostrais. No primeiro tratamento, o aumento de N-amoniaco no solo foi registrado já para uma hora após sua aplicação, enquanto no segundo tratamento o aumento das concentrações de N-amoniaco foi registrado apenas 24 horas após adição de água e nutrientes, tendo permanecido mesmo 48 horas depois (Figura 35-e).



**Figura 35.** Valores médios de (a) umidade (%), (b) pH em água e (c) em CaCl<sub>2</sub> e concentrações de (d) N-nítrico (mg.kg<sup>-1</sup>), (e) N-amoniaco (mg.kg<sup>-1</sup>) e

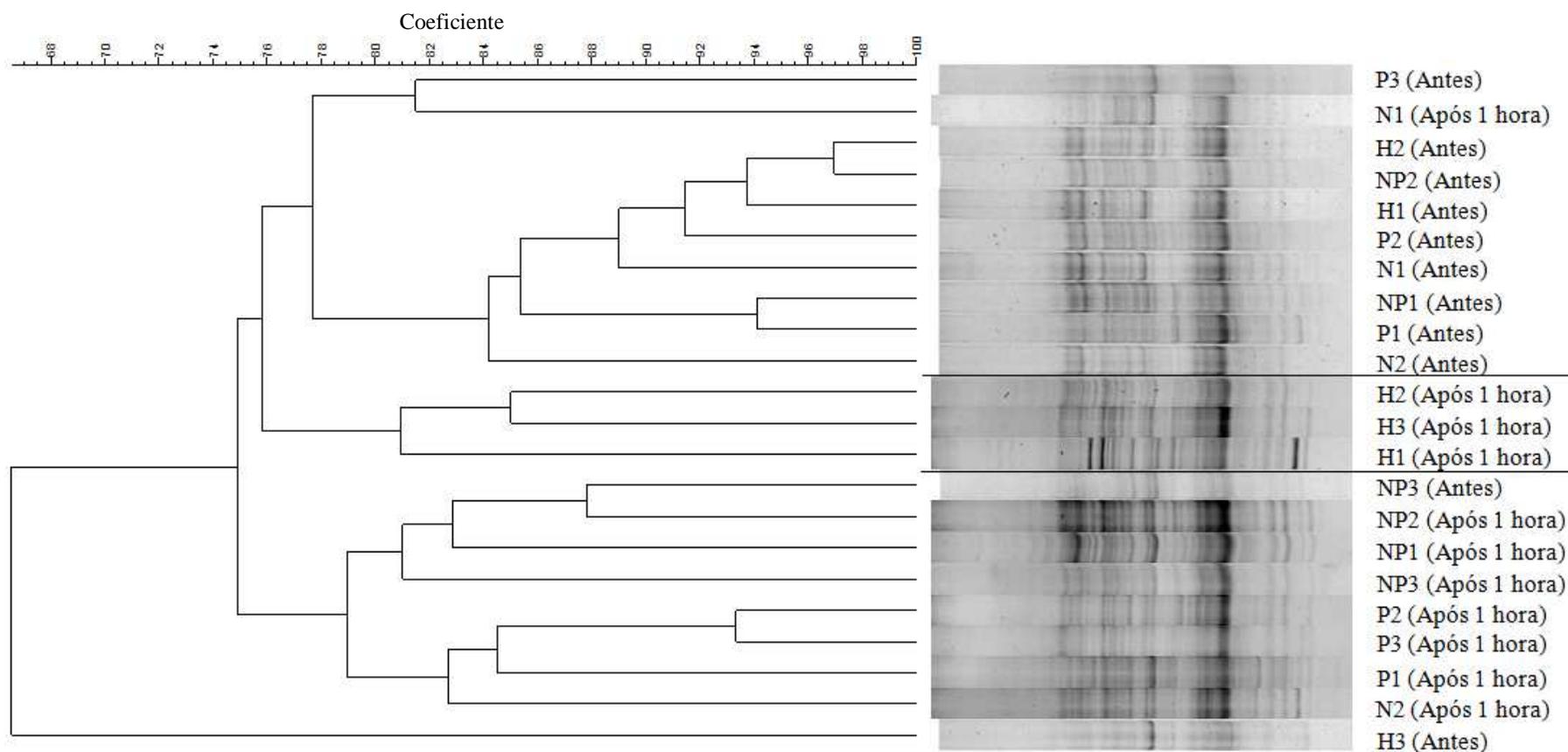
(f) fósforo disponível ( $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) no solo das subparcelas estabelecidas na comunidade úmida da mata do Pitoco, antes da adição (tempo 0) e 1 hora, 24 horas e 48 horas após adição de água ( $\text{H}_2\text{O}$ ); água +  $\text{NH}_4^+$  (**N**); água +  $\text{PO}_4^-$  (**P**); e água +  $\text{NH}_4^+$  +  $\text{PO}_4^-$  (**N+P**). Barras verticais representam os desvios padrão, letras minúsculas indicam diferenças significativas entre tratamentos e letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre períodos.

### 7.2.3 Perfis das comunidades bacterianas

A premissa de que todas as subparcelas estão em condições similares antes da aplicação dos tratamentos é essencial para garantir que o resultado observado seja claramente fruto das variáveis que estão sendo testadas. Pela análise de RISA, identificou-se que os perfis da comunidade bacteriana proveniente de uma subparcela destinada ao tratamento água + amônio apresentou coeficiente de similaridade extremamente baixo (20%) ao ser comparada com as outras subparcelas do delineamento experimental. Esse padrão foi observado em todos os tempos amostrais analisados no estudo e não apenas antes da aplicação dos tratamentos. Por esse motivo, optou-se por excluir essa subparcela dos dendrogramas de similaridade e os perfis da comunidade bacteriana das subparcelas submetidas ao tratamento água + amônio foram analisados em duplicata biológica.

#### I. Comparação entre perfis antes e uma hora após aplicação dos tratamentos

As análises dos géis de RISA com perfis das comunidades bacterianas do solo estão apresentadas nas figuras 36, 37, 38 e 39. Através dos dendrogramas, observou-se resposta imediata das comunidades bacterianas à adição de água e nutrientes no solo. Na comparação dos perfis da comunidade bacteriana antes e após uma hora da adição (figura 36), observou-se maior agrupamento entre perfis antes da adição de água e nutrientes, apesar de algumas amostras desse tempo amostral terem se revelado mais distintas ao não se agruparem com o *cluster* principal.



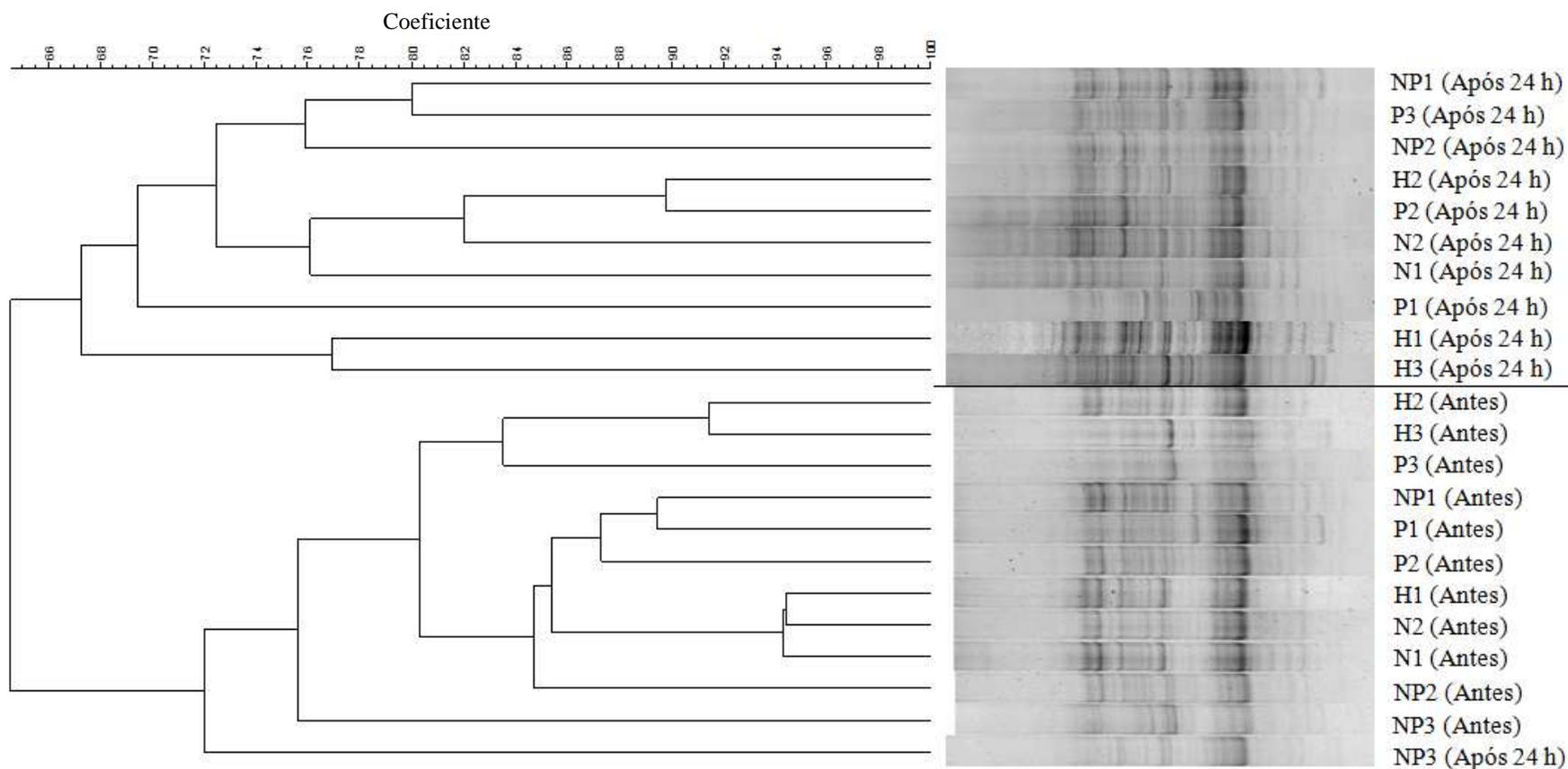
**Figura 36.** Dendrograma com relação de similaridade (UPGMA com coeficiente de DICE) entre perfis das comunidades bacterianas presentes no solo das subparcelas do experimento estabelecido na comunidade úmida da mata do Pitoco antes e após uma hora da dição de água (**H1, H2, e H3**), água +  $\text{NH}_4^+$  (**N1, N2 e N3**); água +  $\text{PO}_4^-$  (**P1, P2 e P3**); e água +  $\text{NH}_4^+$  +  $\text{PO}_4^-$  (**NP1, NP2 e NP3**) no solo.

Após uma hora da adição dos nutrientes, houve uma separação dos perfis de acordo com a resposta da comunidade às soluções aplicadas em cada subparcela. No dendrograma da figura 36, os perfis bacterianos das subparcelas onde foi adicionada apenas água agruparam-se em um único *cluster*. Este *cluster* se separou, com 75% de similaridade, das comunidades cujos solos receberam água e nutrientes, e apresentou maior similaridade (76%) com perfis das comunidades presentes no solo antes da aplicação dos tratamentos.

As comunidades de bactérias presentes nas subparcelas onde foi adicionada água + nutrientes apresentaram resposta imediata à aplicação dos tratamentos (Figura 36). Esse padrão, além de perceptível pela diferenciação em relação aos solos que receberam apenas água, é também observável pelo agrupamento de comunidades que receberam água + N-amoniaco + fosfato (81% de similaridade) e pela formação de um segundo grupo com comunidades que responderam à aplicação de água + fosfato (82% de similaridade). Os perfis das subparcelas com aplicação de água + N-amoniaco apresentaram 75 % de similaridade entre si (Figura 36).

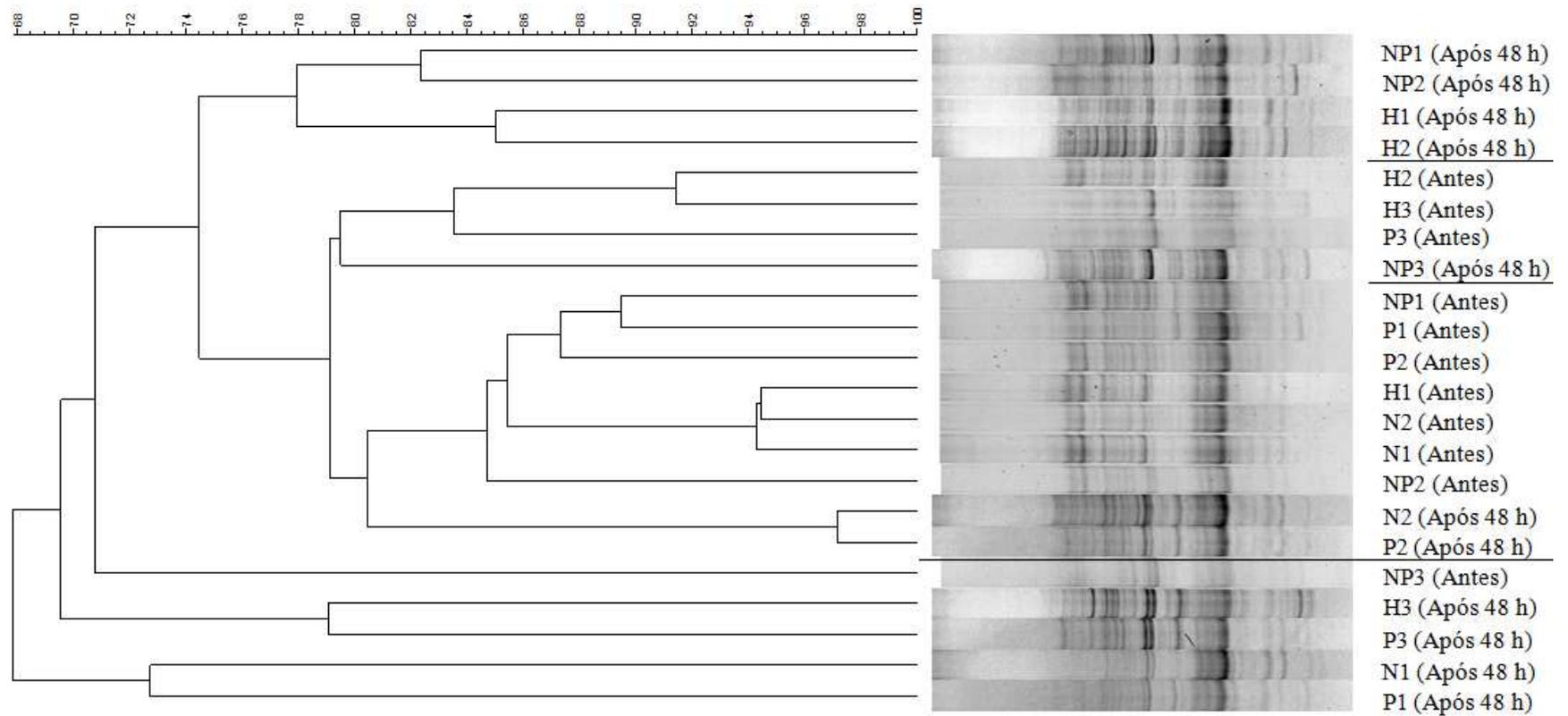
## II. Comparação entre perfis antes e 24 horas após aplicação dos tratamentos

Após 24 horas da aplicação dos tratamentos, foi possível observar maior diferenciação das comunidades de bactérias em relação ao que foi visto antes da adição de água e nutrientes (Figura 37). Após 24 horas da aplicação dos tratamentos as comunidades bacterianas apresentaram similaridade de 66% com aquelas observadas antes da aplicação, enquanto para uma hora após o início do experimento essa similaridade era de aproximadamente 75% (Figura 36). Além disso, após 24 horas da aplicação dos tratamentos, os perfis bacterianos tornaram-se mais similares entre si e o agrupamento de acordo com o tratamento foi menos evidente do que o observado para após uma hora (Figuras 36 e 37). Esse resultado pode indicar menor influência dos nutrientes sobre a diversidade das comunidades de bactérias um dia após aplicação dos tratamentos, havendo apenas a influência da água que foi adicionada em todas as subparcelas e que pode ser a causa principal de diferenciação das comunidades bacterianas na comparação entre antes e após 24 horas da aplicação dos tratamentos.

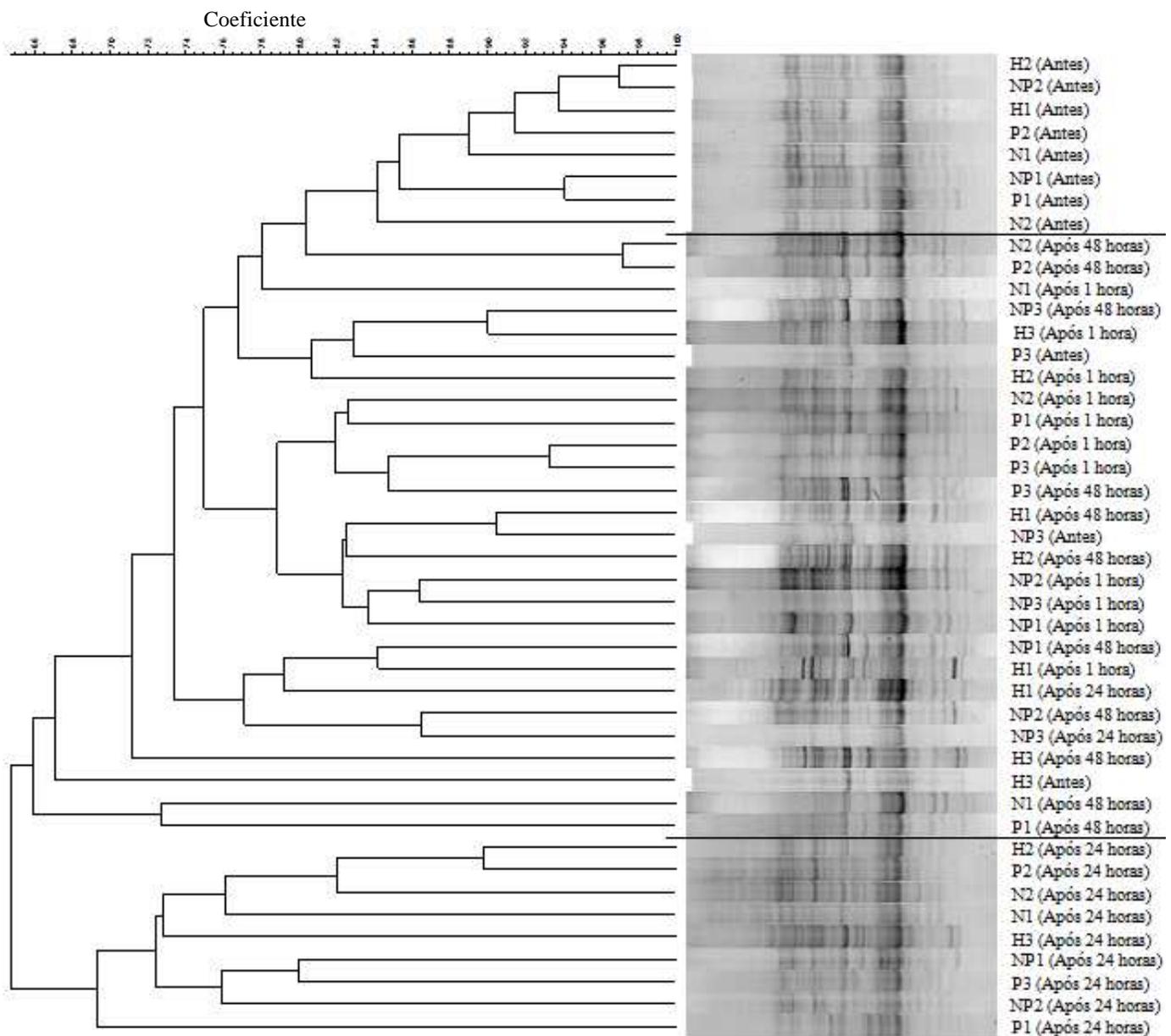


**Figura 37.** Dendrograma com relação de similaridade (UPGMA com coeficiente de DICE) entre perfis das comunidades bacterianas presentes no solo das subparcelas do experimento estabelecido na comunidade úmida da mata do Pitoco antes e após 24 horas da adição de água (**H1, H2, e H3**), água +  $\text{NH}_4^+$  (**N1, N2 e N3**); água +  $\text{PO}_4^-$  (**P1, P2 e P3**); e água +  $\text{NH}_4^+$  +  $\text{PO}_4^-$  (**NP1, NP2 e NP3**) no solo.

Coeficiente



**Figura 38.** Dendrograma com relação de similaridade (UPGMA com coeficiente de DICE) entre perfis das comunidades bacterianas presentes no solo das subparcelas do experimento estabelecido na comunidade úmida da mata do Pitoco antes e após 48 horas da adição de água (**H1, H2, e H3**), água +  $\text{NH}_4^+$  (**N1, N2 e N3**); água +  $\text{PO}_4^-$  (**P1, P2 e P3**); e água +  $\text{NH}_4^+$  +  $\text{PO}_4^-$  (**NP1, NP2 e NP3**) no solo.



**Figura 39.** Dendrograma com relação de similaridade (UPGMA com coeficiente de DICE) entre perfis das comunidades bacterianas presentes no solo das subparcelas do experimento estabelecido na comunidade úmida da mata do Pitoco antes e após uma hora, 24 horas e 48 horas da adição de água (**H1, H2, e H3**); água +  $\text{NH}_4^+$  (**N1, N2 e N3**); água +  $\text{PO}_4^-$  (**P1, P2 e P3**); e água +  $\text{NH}_4^+$  +  $\text{PO}_4^-$  (**NP1, NP2 e NP3**) no solo.

### III. Comparação entre perfis antes e 48 horas após aplicação dos tratamentos

A figura 38 mostra a relação de similaridade entre comunidades de bactérias presentes no solo antes e após 48 horas da aplicação dos tratamentos. Por esse dendrograma é possível observar uma menor influência dos tratamentos sobre as comunidades bacterianas e uma similaridade entre os perfis dos dois tempos amostrais equivalente ao observado entre antes e após uma hora da adição de água e nutrientes no solo (aproximadamente 75 %) (Figuras 36 e 38). Após 48 horas da adição, a similaridade entre os perfis das comunidades bacterianas variou entre 68 e 92%.

Na comparação entre todos os tempos amostrais (Figura 39), houve uma confirmação dos padrões de similaridade observados nos dendrogramas anteriores. As comunidades bacterianas 24 horas após adição de água e nutrientes foram as que apresentaram menor similaridade (65%) com aquelas presentes no solo antes da adição. Além disso, os tempos amostrais de uma hora e 48 horas após adição agruparam-se, apresentando similaridade que variou entre 70% e 90%, e foram mais similares à comunidade presente no solo antes da adição (70 a 80% de similaridade).

## 8. Discussão

Os perfis microbianos obtidos com RISA refletem a composição dominante da comunidade de bactérias presente no solo, pois são utilizados primers de regiões intergênicas que permitem diferenciar espécies muito proximamente relacionadas (Fisher & Triplett, 1999). A interpretação desse tipo de gel pode ser feita pela análise da intensidade de suas bandas, o que estaria refletindo de forma grosseira a abundância das populações na comunidade, e pela presença ou ausência de bandas, indicando a flutuação das populações de espécies mais abundantes na comunidade estudada (Kirk *et al.*, 2004).

A análise de RISA forneceu uma medida da diversidade de espécies dominantes nas comunidades bacterianas dos solos das matas de galeria do Pitoco, Monjolo e Taquara e produziu padrões de bandas reproduzíveis. Esses padrões mostraram diferenças na distribuição das bandas refletindo composições distintas de comunidades bacterianas em função da

sazonalidade da precipitação, do gradiente topográfico e da ocorrência de incêndio acidental. No entanto, foram encontradas diversas bandas em perfis distintos com peso molecular em comum, indicando que muitas espécies das comunidades bacterianas são resistentes a tais influências ambientais.

Na mata do Pitoco, a comunidade de bactérias do solo sofreu maior influência do gradiente topográfico do que da sazonalidade de precipitação, assim como foi observado na mata do Monjolo. Já na mata do Taquara, diferenças nas comunidades bacterianas entre estações seca e chuvosa foram notáveis, e o gradiente topográfico foi fator influenciador da composição das comunidades bacterianas na estação seca e nas transições entre estações.

### **8.1. Efeito da sazonalidade da precipitação**

A hipótese de que haveria diferenciação das comunidades bacterianas do solo das matas de galeria em função da sazonalidade da precipitação (H1) foi corroborada, em especial na mata do Taquara. Estudos anteriores realizados em formações savânicas do bioma Cerrado também mostraram que a sazonalidade bem marcada da precipitação ocasiona mudanças nas comunidades microbianas do solo (Viana *et al.*, 2011; Silva, 2004; Bresolin *et al.*, 2010) em função dos efeitos sobre as características químicas do solo, que gera efeitos diretos sobre os microrganismos e sobre o funcionamento da comunidade de plantas.

O teor de umidade do solo apresentou variação clara entre as estações, tendo sido significativa nas matas do Pitoco, Monjolo e Taquara. Aparentemente, a comunidade bacteriana da mata do Taquara foi a mais susceptível à sazonalidade, pois seus perfis de diversidade se diferenciaram mais entre estações seca e chuvosa do que entre as comunidades seca e úmida de cada mata. Como mostrado por Mendes *et al.* (2012), a biomassa e atividade microbiana do solo de fitofisionomias do Cerrado, inclusive Mata de Galeria, são sujeitas à sazonalidade da precipitação, tanto em função da entrada de água e aumento da umidade do solo, como em decorrência das mudanças fisiológicas por que passam a vegetação. No entanto, não há estudos anteriores que tenham avaliado possíveis influências da sazonalidade da precipitação sobre a diversidade de bactérias no solo de matas de galeria do Cerrado.

Atividades enzimáticas específicas são apontadas como fortemente correlacionadas com a composição da comunidade microbiana do solo (Waldrop *et al.*, 2000). Enzimas como

fosfatase ácida e  $\beta$ -glicosidase foram vistas com maior atividade na estação chuvosa em solos de mata de galeria (Mendes *et al.*, 2012). Dessa forma, assim como a atividade, a composição da comunidade microbiana pode responder a variações estacionais de umidade e características químicas no solo (Fierer *et al.*, 2002; Gordon *et al.*, 2008).

Em ecossistemas com sazonalidade da precipitação bem definida, como em Manipur, Índia, a biomassa microbiana e o N e P associados a ela variam positivamente com o teor de umidade do solo (Devi & Yadava, 2006). Em ambientes áridos, como no deserto de Chihuahuan (Texas, EUA), variações sazonais da precipitação também influenciam a composição da comunidade bacteriana do solo. Nesse ecossistema, Clark *et al.* (2009) observaram que na época de maior precipitação, perfis de DGGE apresentaram maior número de bandas, provavelmente em função do aumento do teor de umidade no solo.

A variação sazonal da precipitação acarreta em variação de parâmetros como pH, teor gravimétrico do solo e C na biomassa microbiana em áreas de cerrado (Bresolin *et al.*, 2010), ocasionando mudanças na densidade total de microrganismos do solo e na abundância de grupos microbianos, principalmente bactérias gram-negativas e gram-positivas (Viana *et al.*, 2011). No estudo de Bresolin *et al.* (2010), mudanças sazonais no pH e no conteúdo gravimétrico de água em solos de cerrado afetaram a composição das populações bacterianas analisadas pela técnica de PCR-DGGE.

Apesar de variações no pH do solo serem apontadas como principais responsáveis por variações na composição de comunidades bacterianas do solo (Lauber *et al.*, 2009), esse parâmetro não parece ter sido um fator relevante para as variações encontradas nos perfis de diversidade do presente estudo, já que houve pouca variação do pH do solo nas três matas de galeria ao longo da sazonalidade da precipitação. Em contrapartida, concentrações de fósforo, N-nítrico, N-amoniaco, potássio e cálcio variaram entre estações seca e chuvosa em uma ou mais matas estudadas. Sabe-se que a disponibilização de nutrientes em solos de matas de galeria é dependente da mineralização da matéria orgânica (Parron *et al.*, 2003) e essa advém, em sua maioria, da serapilheira depositada sobre o solo. Portanto, variações sazonais da qualidade e quantidade da serapilheira no solo podem influenciar a composição da comunidade bacteriana através de processos biogeoquímicos, como decomposição da matéria orgânica (Leff *et al.*, 2012).

Em matas de galeria do Cerrado, a sazonalidade da precipitação já foi vista como influente na produção e qualidade da serapilheira. Em estudo anterior realizado na mata do Pitoco, observou-se que a produção de serapilheira foi maior na estação seca (entre julho e setembro – 7,0 t.ha<sup>-1</sup>) que na estação chuvosa (6,1 t.ha<sup>-1</sup>) (Parron *et al.*, 2004). Quanto a sua qualidade, na estação seca foram encontradas menores concentrações de N, P e S na serapilheira, enquanto na estação chuvosa a serapilheira apresentou menor concentração de K (Parron *et al.*, 2004). Essa disponibilidade diferenciada de nutrientes no solo advindos da serapilheira no decorrer da sazonalidade da precipitação pode ter sido um fator importante para variações na composição da comunidade bacteriana das matas estudadas no presente estudo.

Relações entre a disponibilidade de matéria orgânica e a relativa abundância de subfilos e filos de microrganismos já foram observados em diferentes ecossistemas como florestas tropicais, deserto e pradaria (Fierer *et al.*, 2007; Nemergut *et al.*, 2010). Em florestas tropicais, a disponibilidade de C no solo apresenta correlação positiva com a abundância relativa de alguns grupos de microrganismos, como Bacteroidetes, Betaproteobacteria (Fierer *et al.*, 2007), Actinobacteria, Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria (Nemergut *et al.*, 2010). Já Acidobacteria é relatada por apresentar correlação inversa com a disponibilidade de C no solo (Fierer *et al.*, 2007; Nemergut *et al.*, 2010). Esses estudos não apenas sugerem que mudanças na disponibilidade de C podem alterar a composição da comunidade bacteriana do solo, como também proveem justificativas importantes na correlação entre qualidade da matéria orgânica, processos de decomposição e estrutura das comunidades microbianas (Leff, *et al.*, 2012).

Adicionalmente, a sazonalidade da precipitação acarreta em variações temporais no potencial redox do solo, que podem resultar em diferenciação estrutural da comunidade microbiana (Silver *et al.*, 1999). Solos tropicais são altamente dinâmicos e a flutuação na disponibilidade de oxigênio, que se torna ainda mais oscilante com a sazonalidade da precipitação (Silver *et al.*, 1999), pode acarretar em alterações na comunidade bacteriana (Pett-Ridge & Firestone, 2005). A frequência de mudanças no potencial redox pode resultar em efeitos diretos na composição e funcionamento de comunidades bacterianas, por modificar o balanço entre espécies aeróbicas e anaeróbicas (Fierer & Schimel, 2002). Nesses

ecossistemas, a combinação de grande disponibilidade de carbono, altas temperaturas e umidade, solos argilosos com grande capacidade de retenção de água e alta atividade metabólica pode resultar em condições em que O<sub>2</sub> é rapidamente e completamente consumido no solo (Frangi, 1983 *apud* Pett-Ridge & Firestone, 2005). Baixas concentrações de O<sub>2</sub> estão associadas com aumento de C lábil (McGroddy & Silver, 2000) e redução no potencial redox, que torna o ambiente apropriado para o processo de metanogênese (Keller *et al.*, 1986; Liu *et al.*, 1997; Silver *et al.*, 1999).

### *8.1.1 Transições entre estações*

Comunidades bacterianas nas transições entre estações apresentaram perfis de diversidade diferenciados aos encontrados no auge das estações seca e chuvosa. Esse padrão foi mais perceptível nas matas do Pitoco e do Taquara, enquanto na mata do Monjolo, possíveis diferenças entre estações e transições estacionais foram provavelmente mascaradas pelo efeito da topografia da mata.

Nas transições, foram registrados teores de umidade no solo intermediários aos encontrados no auge das estações seca e chuvosa. Esse gradiente temporal da precipitação pode ter influenciado o estabelecimento de comunidades bacterianas transientes entre as encontradas no solo durante o auge das estações seca e chuvosa.

O período de transição entre estações seca e chuvosa já foi visto como importante em processos mediados por microrganismos no cerrado e em áreas de pastagem, como na produção de gases traço (Pinto *et al.*, 2002; Varella *et al.*, 2004). No cerrado, os fluxos de NO e de CO<sub>2</sub> no solo aumentaram em até três vezes 30 minutos após chuva simulada no meio da estação seca, tendo sido associados a respostas imediatas da comunidade microbiana ao aumento de umidade no solo (Pinto *et al.*, 2002). Adicionalmente, a biomassa microbiana do solo do cerrado aumenta no início da estação chuvosa (transição seca-chuva), provavelmente em função da entrada de carbono acumulado durante a estação seca e pelo aumento da umidade do solo (Nardoto & Bustamante, 2003).

Na floresta subtropical de Belize (América Central), a transição entre estações seca e chuvosa também já foi estudada. Com as primeiras chuvas após estação seca, há um rápido

aumento do carbono da biomassa microbiana, de carbono orgânico e das taxas de nitrificação no solo 12 horas após o que se considera início da estação chuvosa na região (Eaton, 2001). Já em savanas africanas, a adição experimental de água no solo leva a rápido aumento dos fluxos de CO<sub>2</sub>, refletindo aumento da respiração microbiana. Nesse estudo, a resposta foi mais expressiva em parcelas com vegetação arbórea do que graminosa, indicando que a quantidade de C no solo associada à vegetação também influencia a resposta da comunidade microbiana à entrada de água após período de seca (McCulley et al, 2007).

Apesar das informações relevantes, é válido ressaltar que nenhum dos trabalhos anteriormente relatados avaliou mudanças na diversidade microbiana do solo no decorrer da transição entre estações seca e chuvosa. A avaliação de mudanças temporais da diversidade em comunidades bacterianas nas três matas de galeria do presente estudo, juntamente com a simulação da primeira chuva após estação seca na mata do Pitoco vem contribuir para um possível preenchimento dessa grande lacuna.

O experimento de adição de água e nutrientes no solo da mata do Pitoco corroborou com as observações relatadas anteriormente, quanto a alterações na diversidade das comunidades bacterianas do solo das matas de galeria no período de transição entre estações seca e chuvosa. Os perfis de diversidade bacteriana mudaram rapidamente após a adição experimental de água, indicando diferenças claras entre comunidades antes e até dois dias após adição, o que corroborou claramente com a hipótese H2. Essa diferenciação ocorreu mesmo não tendo sido identificadas diferenças significativas entre os tempos amostrais quanto ao teor de umidade do solo. Apesar da diferenciação mais pronunciada dos perfis bacterianos ter ocorrido 24 horas após aplicação dos tratamentos, ainda foi possível observar influência dos tratamentos sobre a comunidade de bactérias 48 horas após adição, resultando em uma comprovação parcial com a hipótese H3.

Em solos de pastagens em recuperação no Cerrado, as comunidades bacterianas responderam prontamente a adição de água no solo durante estação seca, tendo sua diversidade modificada em resposta ao aumento de umidade, como foi avaliado pela técnica de PCR-DGGE (Pinto *et al.*, 2006). Esse trabalho, juntamente com o presente estudo, indica que, além da atividade microbiana, transições entre estações influenciam a composição da microbiota do solo, já que respostas da comunidade microbiana à diminuição ou aumento da

umidade no ambiente tendem a variar de acordo com os grupos taxonômicos que a compõe (Gordon *et al.*, 2008).

A rápida resposta da comunidade microbiana à entrada de água já foi associada a processos biogeoquímicos, como maior fluxo de óxido nítrico (NO) logo após aumento da umidade do solo em áreas de pastagem (Pinto *et al.*, 2006) e com a entrada de N a partir da matéria orgânica, que é diretamente relacionada à disponibilidade intermitente de água em ambientes áridos e semiáridos (Austin *et al.*, 2004). Em ecossistema semiárido, ao simular ciclos de seca e chuva, foi observado que os microrganismos promovem aumento de imobilização, seguido por grande mineralização de N e nitrificação no período de um a três dias após adição de água no solo (Dijkstra *et al.*, 2012). No cerrado, o mesmo foi observado por Nardoto & Bustamante (2003), que associaram o aumento da nitrificação e da mineralização de N a um concomitante aumento da atividade microbiana logo após as primeiras chuvas depois da estação seca.

No presente estudo, foram observadas concentrações de N-nítrico no solo duas a oito vezes maiores após adição de água e nutrientes nas parcelas experimentais. Esse aumento pode ser indício de maior mineralização de amônio pela comunidade microbiana logo após entrada de água nas parcelas. As concentrações de N-amoniacal, apesar de terem aumentado em até duas vezes após adição, não apresentaram alterações tão expressivas como para N-nítrico. Esse resultado divergiu de estudo desenvolvido no cerrado (Nardoto & Bustamante, 2003), que observou aumento significativo apenas na concentração de N-amoniacal com as primeiras chuvas após estação seca. No entanto, em ecossistema semiárido, a adição de água no solo resultou em aumento tanto de amônio como de nitrato (Dijkstra *et al.*, 2012), de forma similar ao observado no presente estudo.

O aumento diferenciado das concentrações de N-nítrico e N-amoniacal no solo após entrada de água pode ser resultado da rápida utilização de amônio pelos microrganismos, que tende a ser mais assimilado que nitrato (Vitousek & Matson, 1988; Silver *et al.*, 2001). A captação de amônio é favorecida por ser uma forma de N que não necessita ser reduzida antes da assimilação, ao contrário do nitrato, diminuindo dessa forma o gasto energético empregado (Puri & Ashman, 1999).

A hipótese (H4) de que o perfil de diversidade bacteriana nas parcelas onde houve apenas adição de água é distinto do encontrado nas parcelas que receberam água e nutrientes também foi corroborada. No entanto, a resposta da comunidade bacteriana à adição de nutrientes foi mais expressiva apenas na primeira hora após adição. Vinte e quatro horas depois, a diferenciação dos perfis da comunidade em relação aos obtidos antes da adição pareceu ser resultado mais da entrada de água do que dos nutrientes, já que não houve agrupamento dos perfis de acordo com o tratamento aplicado.

O aumento da diversidade de bactérias após adição de grandes quantidades de nitrogênio em solos e sedimentos é conhecido em outros ecossistemas. Através da técnica de PCR-DGGE e sequenciamento já foram identificadas mudanças na composição das comunidades bacterianas oxidadoras de amônio e aumento da dominância de alguns grupos em detrimento de outros como respostas da comunidade de bactérias a entrada excessiva desse nutriente (Nicolaisen & Ramsing, 2002; Chu *et al.*, 2007; Chu *et al.*, 2008). Quanto ao fósforo, apesar de estudos em áreas temperadas indicarem que mesmo altas concentrações do nutriente parecem não resultar em alterações na diversidade bacteriana do solo de áreas agricultáveis (Chu *et al.*, 2007; Chu *et al.*, 2008), no Cerrado, já foi visto que a adição desse nutriente ao solo leva a modificações na atividade microbiana, principalmente de fosfatase (Matsuoka *et al.*, 2003; Carneiro *et al.*, 2004). Além disso, um estudo realizado em latossolos com plantações de milho sob diferentes concentrações de P mostrou que a estrutura populacional genética e metabólica de bactérias da rizosfera foi mais influenciada pelo teor de fósforo no solo do que pela eficiência das plantas em usar o fósforo (Oliveira *et al.*, 2009).

A quantidade de nitrogênio e fósforo em fertilizantes adicionados ao solo na agricultura supera em cerca de 5.000 e 100.000 vezes, respectivamente, a quantidade lixiviada da serapilheira e depositada sobre o solo com as primeiras chuvas após estação seca (Chu *et al.*, 2007; Parron, 2004). A baixa quantidade de nitrogênio e fósforo aplicada às subparcelas do presente estudo pode ter sido pouco efetiva sobre a diversidade das comunidades de bactérias, que apontaram mudanças perceptíveis pela técnica de RISA apenas na primeira hora após adição. Esse padrão pode significar que a entrada de nitrogênio e/ou fósforo com as primeiras chuvas leva a uma resposta imediata da comunidade bacteriana, mas que não se sustenta em longo prazo, podendo ser perdida já nas primeiras 24 horas após a adição dos nutrientes. Nesse

período, apesar da resposta aos nutrientes diminuir, a comunidade de bactérias ainda responde à entrada de água, chegando ao seu ápice de diferenciação um dia após adição.

## **8.2. Efeito do gradiente topográfico**

A hipótese (H5) de que comunidades bacterianas do solo se diferenciariam ao longo do gradiente topográfico das matas foi corroborada no presente estudo. No entanto, apenas na mata do Taquara as comunidades bacterianas das porções seca e úmida se diferenciaram mais na estação seca que na chuvosa, como também foi proposto nessa hipótese. Influências da topografia sobre a diversidade de bactérias do solo foram observadas inclusive após o incêndio, pois houve agrupamento de perfis de RISA em função do gradiente topográfico das matas.

A topografia das matas apresentou efeito mais notável sobre a composição da comunidade bacteriana do solo do que a sazonalidade da precipitação. Apesar das três matas de galeria apresentarem gradiente topográfico acentuado em alguns pontos do leito dos respectivos córregos (Silva Júnior, 1995), as regiões de cada mata que foram selecionadas para o estabelecimento das parcelas amostrais apresentavam larguras distintas entre a margem do córrego e a borda da mata que faz divisa com outras fitofisionomias do bioma. O gradiente topográfico da mata do Taquara, apesar de apresentar grande declividade, foi o mais estreito dentre as três matas estudadas (40 m aproximadamente), com maior proximidade entre as comunidades florísticas seca e úmida. As matas do Monjolo e do Pitoco apresentaram gradiente topográfico mais extenso (70 m aproximadamente). Assim como a mata do Taquara, a mata do Monjolo possui gradiente topográfico com declividade bastante acentuada, distinto do observado na mata do Pitoco.

A variação de diversidade de comunidades bacterianas ao longo do gradiente topográfico acompanhou variações do teor gravimétrico de água do solo, principalmente nas matas do Pitoco e Taquara. A diminuição da umidade do solo com o distanciamento do córrego provavelmente está correlacionada com a distribuição diferenciada de espécies vegetais dentro da floresta, bem como com propriedades físicas e químicas do solo (Haridasan *et al.*, 1996; van den Berg & Santos, 2003).

Alguns estudos já mostraram maiores taxas de atividade microbiana com o aumento do conteúdo de água no solo (Doran *et al.*, 1990). Fatores como temperatura, umidade e a sazonalidade desses dois parâmetros atuam no controle da atividade microbiana em solos de áreas úmidas, como florestas ripárias, resultando em mudanças importantes nos ciclos biogeoquímicos (Gutknecht *et al.*, 2006).

Além da atividade microbiana, a composição da microbiota do solo também pode variar no decorrer de um gradiente topográfico, como observado no presente estudo, seja pela variação de umidade e de características físico-químicas do solo, ou pela variação na comunidade vegetal ali presente (Kang & Mills, 2004; Rinklebe & Langer, 2006; Tsai *et al.*, 2009). Kang & Mills (2004) simularam efeitos da variação da umidade do solo sobre comunidades microbianas e observaram, através da técnica de PCR-DGGE, alteração de perfis da comunidade bacteriana em função do gradiente topográfico estabelecido na área de estudo. Adicionalmente, experimentos que controlam o conteúdo de água do solo já mostraram que ao aumentar o nível de água há um concomitante aumento das taxas de processos anaeróbicos (ex. desnitrificação, metanogênese e redução de sulfato) e diminuição das taxas de processos aeróbicos (ex. nitrificação), resultando em alteração do potencial redox, em restrição da disponibilidade de oxigênio e em aumento de microambientes anaeróbicos no solo (Keller *et al.*, 1986; Liu *et al.*, 1997; Silver *et al.*, 1999), que acarreta em alterações na composição das comunidades microbianas ali presentes (Sundh *et al.*, 1997; Mentzer *et al.*, 2006; Pett-Ridge & Firestone, 2005).

Além da umidade, as características físico-químicas do solo são de extrema importância na composição da microbiota edáfica. As variações nos perfis bacterianos observadas entre comunidades seca e úmida dentro de uma mesma mata podem ter sido influenciadas pelas características distintas de concentração de nutrientes e matéria orgânica no solo. Na mata do córrego Pitoco, Parron *et al.* (2004) já registrou variação espacial na acumulação de serapilheira em função do gradiente topográfico. A comunidade úmida da mata apresentou menor biomassa anual de serapilheira foliar (4,3 t.ha<sup>-1</sup>) que a comunidade seca (5,2 t.ha<sup>-1</sup>) e durante o ano amostral, a serapilheira foliar da comunidade úmida apresentou menores concentrações de K (27,77 g.kg<sup>-1</sup>), Ca (54,44 g.kg<sup>-1</sup>) e Mg (29,57 g.kg<sup>-1</sup>) que da comunidade seca (K - 36,74 g.kg<sup>-1</sup>; Ca - 76,83 g.kg<sup>-1</sup>; Mg - 39,93 g.kg<sup>-1</sup>).

A produção e a qualidade da serapilheira apresenta grande importância nos processos biogeoquímicos que ocorrem em matas de galeria. A produção de serapilheira é um processo fundamental de transferência de nutrientes da biomassa vegetal para o solo em que ocorre liberação de nutrientes em formas disponíveis às plantas e microrganismos. (Vitousek, 1982; Sandford, 1986). Esses processos mantêm estoques de nutrientes no solo, influenciam a produção primária e regulam o fluxo de energia e a ciclagem de nutrientes nos ecossistemas florestais (Proctor, 1984; Schlesinger, 1997). Portanto, a composição da comunidade bacteriana pode estar sendo afetada pela produção diferenciada de serapilheira e alocação desigual dos nutrientes entre comunidades seca e úmida das matas de galeria do Pitoco, Monjolo e Taquara. Na mata do Monjolo, concentrações de matéria orgânica, cálcio e capacidade de troca catiônica (CTC) apresentaram variação significativa ao longo do gradiente topográfico. Na mata do Pitoco, as concentrações de potássio e cálcio foram distintas nas comunidades seca e úmida da mata, enquanto no Taquara, além do cálcio, concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  e  $\text{N-NH}_4^+$  também se diferenciaram ao longo do gradiente topográfico.

Na Floresta Amazônica (Brasil), estudos já foram realizados com o intuito de identificarem possíveis influências de gradientes topográficos sobre a disponibilidade de C e N no solo. Ao longo de toposequências na Amazônia, diferentes florestas são encontradas entre o platô e a região de vale, conhecida por baixio. Na região de platô, foram registradas as maiores concentrações de C e N no solo, tendo sido associadas à sua característica textural mais argilosa (Luizão *et al.*, 2004; Nardoto *et al.*, 2008). Esses resultados podem ser uma justificativa para o que foi observado na mata do Taquara, onde as maiores concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  e  $\text{N-NH}_4^+$  foram encontradas na comunidade úmida, cujo solo apresenta maior teor de argila em comparação com a comunidade seca, apesar de ambas serem argilosas (Silva Júnior, 1995).

Todas as amostras de solo do Pitoco, Monjolo e Taquara são consideradas com altos níveis de matéria orgânica, como registrado anteriormente por Silva Júnior (1995), pois variaram entre 11 e 35%. A mata do Monjolo foi a área que apresentou maiores diferenças na concentração de matéria orgânica ao longo do gradiente topográfico, independente da época de coleta, tendo a comunidade seca apresentado concentrações maiores de matéria orgânica que a comunidade úmida, como já registrado em avaliações anteriores (Silva Júnior, 1995).

Esse padrão foi distinto do observado nas matas do Pitoco e Taquara, onde a comunidade úmida apresentou valores ligeiramente maiores de matéria orgânica que a comunidade seca.

A presença de matéria orgânica também pode aumentar a disponibilidade de nutrientes como N, P, K, S, Ca, Fe e Mn, reduzindo efeitos negativos de altas concentrações de Al (Barros, 1979; Pereira & Peres, 1985). Maiores concentrações de nutrientes no solo foram encontradas em uma mata de galeria em comparação com campo sujo, cerrado ralo e cerrado *sensu stricto*. Adicionalmente, maior biomassa microbiana e alta atividade, especialmente de arylsulfatase (0-5 cm de profundidade) foram determinadas no solo da mata de galeria, tendo relacionado esse resultado às características da vegetação que levam a maior entrada de matéria orgânica no solo (Mendes *et al.*, 2012). Araujo *et al.* (2012), ao compararem comunidades bacterianas de diferentes fitofisionomias do Cerrado através da técnica de PCR-RISA, observaram diferenciação dos perfis de Matas de Galeria em relação a Cerrado Denso, Cerrado *sensu stricto* e Campo Sujo. Esse padrão foi ainda confirmado pela técnica de pirosequenciamento, que resultou em maior riqueza de espécies em Matas de Galeria do que nas outras fitofisionomias (Araujo *et al.*, 2012).

Estudos apontam para a grande influência das características da vegetação sobre a composição da comunidade microbiana do solo, já que quantidade e qualidade da serapilheira e da matéria orgânica, assim como particularidades da rizosfera, estão diretamente associadas a ela. A diferenciação das comunidades bacterianas ao longo do gradiente topográfico das matas de galeria estudadas no presente trabalho pode ter sido influenciada ainda, pelas espécies vegetais particulares às comunidades florísticas seca e úmida de cada mata. Em matas de galeria, o gradiente topográfico e as características edáficas do solo levam a diferenciações da comunidade vegetal em porções distintas da mata. Diversos estudos já mostraram que ao longo de gradientes topográficos as diferentes comunidades vegetais encontradas apresentam algumas espécies distintas, adaptadas às condições ambientais e edáficas particulares a cada porção da mata (Silva Júnior, 1995; Silva Júnior, 2001; van den Berg, 2001; Botrel *et al.*, 2002; Cardoso & Schiavini, 2002).

No entanto, a maioria dos estudos que visam identificar influências das comunidades de plantas sobre a diversidade da microbiota do solo tende a utilizar áreas de pastagem e agricultura. Esses trabalhos frequentemente objetivam identificar influências de espécies

vegetais e possíveis alterações no uso da terra sobre a composição da comunidade microbiana do solo (Wieland *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2007; Briones *et al.*, 2003; Segundo Singh *et al.*, 2004). Em estudo metagenômico do gene 16S rDNA, observou-se que solos de pastagem antiga e pastagem convertida mais recentemente apresentavam raízes filogenéticas de microrganismos mais próximas que as encontradas em áreas de cerrado nativo (*sensu stricto*), provavelmente por diferenças na comunidade vegetal (Quirino *et al.*, 2009). Bossio *et al.* (2005) também observaram o efeito da vegetação na determinação da comunidade bacteriana de solos tropicais quando comparou áreas reflorestadas com áreas agrícolas pela técnica de PCR-DGGE 16S rDNA, observando que as comunidades de bactérias dessas duas áreas apresentavam apenas 16% de similaridade de seus perfis (UPGMA-Coefficiente Dice).

Trabalhos que avaliem tais influências em florestas tropicais e/ou ripárias são escassos. A influência da composição e diversidade vegetal de uma floresta tropical na Costa Rica sobre a composição de comunidades microbianas do solo foi avaliada através de perfis de PLFA, tendo sido observadas composições microbianas distintas nos solos de parcelas que possuíam espécies vegetais também diferentes, não havendo necessariamente correlação com a riqueza (número de espécies de plantas) de cada parcela (Carney & Matson, 2006). Isso apontaria uma relação estreita entre composição de espécies vegetais e a diversidade da comunidade microbiana estabelecida no solo de florestas tropicais.

No entanto, os resultados aqui obtidos são os primeiros a indicarem variação de composição da comunidade bacteriana do solo ao longo do gradiente topográfico de matas de galeria do Cerrado, sendo tal variação consequência da heterogeneidade de características físico-químicas, umidade e composição da comunidade vegetal dentro de cada mata. As análises de PCA (*principal component analysis*) com os parâmetros físico-químicos avaliados, apesar de terem apresentado significância estatística de seus eixos, não indicaram tendências de agrupamento das parcelas amostrais, cuja distribuição no diagrama de ordenação foi independente da mata a que pertenciam ou da posição topográfica onde se localizavam dentro de cada mata. Esse resultado pode ser mais um indício da complexidade e heterogeneidade das matas de galeria do Pitoco, Monjolo e Taquara que apresentam grande diversidade de características físico-químicas e biológicas. Também pode ser uma justificativa para a grande variação do coeficiente de similaridade entre perfis RISA das triplicatas

biológicas, já que a diversidade da comunidade bacteriana em cada parcela estaria sendo moldada pelas características edáficas nela encontradas.

### **8.3. Efeito do incêndio acidental**

A hipótese (H6) de que o incêndio acidental ocorrido nas matas alteraria os perfis da comunidade bacteriana do solo foi corroborada pelos resultados do presente estudo. Em todas as matas, as comunidades bacterianas presentes no solo no período pós-fogo se diferenciaram daquelas encontradas no solo antes do incêndio. Tanto a quantidade como a intensidade das bandas foram diferentes após o incêndio e a similaridade entre as comunidades bacterianas dos dois períodos foi de aproximadamente 70% nas três matas de galeria.

Poucos são os estudos que avaliaram mudanças na diversidade de comunidades microbianas do solo após queimadas (Staddon *et al.*, 1996), sendo que a maioria deles apresentam relações entre alterações abióticas causadas pelo fogo e mudanças na atividade e biomassa microbiana. Alguns trabalhos realizados em ecossistemas distintos aos das matas de galeria também mostraram que a composição de comunidades microbianas é alterada após a passagem do fogo, corroborando para os resultados aqui obtidos. Em uma floresta no Canadá, por exemplo, perfis microbianos de RISA e DGGE mostraram clara diferenciação entre comunidades de áreas queimadas e não queimadas (Smith *et al.*, 2008). Analogamente ao resultado obtido com a análise de *fingerprint*, a mensuração de carbono e nitrogênio microbianos também se alterou após o incêndio, indicando grande impacto da queimada sobre essas comunidades (Smith *et al.*, 2008).

O fogo apresenta efeitos distintos sobre a microbiota do solo. O calor liberado durante uma queimada pode resultar em mortalidade diferenciada de grupos de microrganismos (Dunn *et al.*, 1985). Alguns grupos especializados, como bactérias que oxidam N (*Nitrobacter* spp.) são particularmente sensíveis ao calor, enquanto outras bactérias heterotróficas são mais resistentes a altas temperaturas (Hart *et al.*, 2005). No entanto, Vázquez *et al.* (1993) sugerem que mudanças causadas por queimadas no substrato apresentam impacto muito superior na microbiota do que o fogo em si. Mudanças nas características químicas (como disponibilidade de nutrientes, pH) e físicas (como textura, estrutura) do solo, em especial na qualidade e

quantidade da matéria orgânica após queimadas alteram comunidades microbianas e processos por elas catalizados (Bisset & Parkinson, 1980; Hart *et al.*, 2005). Aumentos imediatos na disponibilidade de nutrientes e no pH do solo após o fogo frequentemente resultam em aumento da biomassa e atividade microbiana (DeLuca & Zouhar, 2000; Fisher & Binkley, 2000).

No presente estudo, variáveis do solo também se modificaram após o incêndio acidental. Nas três matas de galeria, duas semanas após incêndio das áreas as concentrações de N-nítrico, N-amoniaco, potássio e cálcio foram até três vezes superiores às registradas antes da passagem do fogo. Nas matas do Pitoco e do Monjolo, pH em CaCl<sub>2</sub> e concentração de fósforo também apresentaram valores mais elevados após passagem do fogo, enquanto na mata do Taquara, houve aumento da concentração de matéria orgânica no solo após a queimada.

Segundo Khanna & Raison (1986) a concentração de cátions, como Ca e K, aumentam consideravelmente na solução do solo imediatamente após a passagem do fogo. No caso do fósforo, já foi visto que sua concentração também tende a aumentar após a queima da vegetação e da serapilheira em florestas ripárias, causando expressivas modificações no ciclo biogeoquímico desse nutriente (Certini *et al.*, 2005). Em solos de cerrado, o pH do solo também tende a ser maior após passagem do fogo, tornando-se menos ácido (Nardoto & Bustamante, 2003) e podendo favorecer o desenvolvimento da comunidade bacteriana em detrimento da fúngica (Bisset & Parkinson, 1980). Há ainda um decréscimo transitório na concentração de matéria orgânica como resultado do consumo pelo fogo (Nardoto & Bustamante, 2003; Certini *et al.*, 2005, Hart *et al.*, 2005), apesar de na mata do Taquara, a concentração de MO no período pós-queima ter sido maior que as registradas antes do incêndio.

Quanto à nitrogênio, imediatamente após passagem do fogo, há um decréscimo da concentração de N orgânico presente no solo em decorrência de volatilização (Fisher & Binkley, 2000 *apud* Hart *et al.*, 2005). No entanto, em questão de poucos dias esse padrão pode ser alterado. Nardoto & Bustamante (2003) estudaram o efeito de queimada prescrita (em julho) sobre as taxas de mineralização líquida de N e biomassa microbiana do solo em áreas de cerrado *stricto sensu*. Houve aumento significativo de N-amoniaco na área queimada (1,5-,8

mg.kg<sup>-1</sup> para 3-34mg.kg<sup>-1</sup>) no período de cinco dias após passagem do fogo, enquanto não houve alteração significativa nas concentrações de N-nítrico. Adicionalmente, a biomassa microbiana aumentou 3,4 vezes no início da estação chuvosa (outubro e novembro) seguinte à queimada prescrita (Nardoto & Bustamante, 2003).

Além da biomassa, há registros de que a composição da comunidade bacteriana também pode ser alterada com o aumento de nutrientes nitrogenados no solo em função da passagem do fogo. Um estudo em floresta de *Pinus* no Novo México mostrou que, um mês após o fogo, valores de pH e da concentração de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> foram maiores nos plots queimados e, através da técnica de T-RFLP, observou aumento na diversidade de bactérias nitrificadoras nas áreas queimadas e alteração na dominância de grupos bacterianos que oxidam amônia, indicando que queimadas podem alterar a composição e a abundância relativa de *taxa* em comunidades de bactérias do solo (Yeager *et al.*, 2005).

Portanto, as modificações causadas pelo fogo sobre o substrato das matas de galeria aqui estudadas podem ter acarretado nas alterações observadas nos perfis de RISA das comunidades bacterianas. O aumento do pH, compostos nitrogenados, P disponível, K, Ca e modificações na concentração de MO podem ter influenciado alterações na comunidade bacteriana, indicando que a passagem do fogo em matas de galeria altera não apenas as comunidades vegetais, mas também a microbiota associada ao solo. A maior intensidade das bandas encontradas nos perfis de RISA após a queimada pode indicar maior abundância dos grupos que compõem as comunidades bacterianas estudadas, e a similaridade de 70% com os perfis anteriores ao distúrbio indica que a composição das comunidades bacterianas também é alterada pela passagem do fogo. Dessa forma, o presente trabalho é o primeiro a mostrar alterações nas comunidades de microrganismos do solo em matas de galeria do Cerrado em função de um distúrbio naturalmente pouco frequente, mas que vem ocorrendo com uma frequência cada vez maior nessas matas de galeria em função da atuação antrópica nas proximidades da reserva.

#### **8.4. Sequenciamento**

Com o sequenciamento das bandas escolhidas nos géis de RISA 16S foi possível verificar a predominância das divisões actinobacteria e proteobacteria. Acidobactérias e

Gemmatimonadetes apresentaram apenas um representante cada dentre as bandas retiradas dos géis.

As actinobactérias são gram-positivas e com alto conteúdo de G+C. Uma característica marcante é a produção de enzimas extracelulares que degradam moléculas complexas comumente encontradas no solo (ex.: húmus, quitina e celulose), além da síntese e excreção de milhares de metabólitos como antibióticos, inseticidas e controladores de ervas daninhas. Neste grupo também são encontrados representantes que realizam o processo de fixação biológica do nitrogênio atmosférico e patógenos de plantas (Moreira & Siqueira, 2002).

No grupo das actinobactérias, alguns *taxa* mais específicos foram possíveis de serem identificados no BLAST. A subordem Acidimicrobineae (ordem Acidimicrobiales) e os gêneros *Acidothermus* (ordem Actinomycetales) e *Acidimicrobium* (ordem Acidimicrobiales) foram identificados em bandas comuns a todas as matas, períodos de coleta e posição no gradiente topográfico. Uma banda identificada como *Streptomyces* (ordem Actinomycetales) também foi ubíqua a todos os perfis analisados. Esse gênero já foi reportado como dominante em solos de florestas por apresentar tolerância à acidez (Davis & Williams, 1970 *apud* Melo, 2002).

Bandas presentes apenas na comunidade úmida das matas foram identificadas como Acidimicrobineae. Já no período pós-fogo, bandas de actinobactérias mais intensas ou identificadas apenas nesse período pertenciam ao gênero *Kitasatospora*, sendo que todas estavam presentes na comunidade úmida da mata. Esse resultado pode indicar grande diversidade de espécies pertencentes ao filo Actinobacteria no solo de matas de galeria.

A divisão proteobacteria, ou bactérias púrpuras, inclui a maioria das bactérias gram negativas, organismos fotossintetizantes e não-fotossintetizantes, anaeróbios e aeróbios, heterotróficos e quimiotróficos. Esse filo é subdividido em classes alfa, beta, gamma, delta e épsilon. A maioria das proteobactérias identificadas dentre as bandas sequenciadas pertencem ao grupo das betaproteobactérias. A esse grupo são incluídas espécies importantes para o ciclo do nitrogênio, como *Nitrosomonas* e *Nitrospira*, responsáveis pela oxidação de amônia (Head *et al.*, 1993).

A espécie *Variovorax paradoxus*, cuja banda de onde foi extraída apresentou maior intensidade na comunidade úmida das matas, é pertencente à classe Betaproteobacteria.

*Variovorax paradoxus* é uma bactéria aeróbica e gram-negativa, ubíqua em diversos ambientes (Jamieson *et al.*, 2009). Essa espécie apresenta uma estratégia de crescimento através da oxidação de gás hidrogênio, que tem sido associada à promoção do crescimento de plantas como parte de um consórcio com organismos diazotróficos noduladores (fixadores de nitrogênio atmosférico) na rizosfera (Maimaiti *et al.*, 2007).

Uma banda identificada como gamaproteobactéria foi observada com mais intensidade e nitidez em perfis de comunidades úmidas das matas. Na classe das gammaproteobactérias incluem bactérias entéricas, pseudomonas fluorescentes, bactérias purpúreas e outras metabolizantes de enxofre (Woese, 1987 *apud* Moreira & Siqueira, 2002).

Outro gênero identificado após sequenciamento foi *Gemmatimonas*, pertencente ao filo Gemmatimonadetes, tendo apresentado alta intensidade de banda em perfis da comunidade úmida do Taquara. Esse grupo de bactérias gram-negativas e aeróbicas é largamente encontrado em ambientes aquáticos e terrestres (Zhang *et al.*, 2003).

O grupo das acidobactérias também estiveram representadas em perfis de RISA. Uma banda presente na mata do Pitoco após o incêndio acidental foi identificada como *Solibacter usitatus*. *Solibacter* foi o gênero mais recentemente proposto nesse filo, que, até o momento, apresenta apenas quatro gêneros (Eichorst *et al.*, 2007). O filo das acidobactérias, encontrado nos mais diversos ambientes, é conhecido pela preferência por ambientes com pH ácido, baixa concentração de O<sub>2</sub> e oligotróficos, apesar de também se desenvolver em condições de alta concentração de nutrientes (Eichorst *et al.*, 2007). A grande variedade já reportada de sequências do gene 16S rDNA de acidobactérias sugere grande plasticidade metabólica (Eichorst *et al.*, 2007), como a encontrada no grupo das proteobactérias (Hugenholtz *et al.*, 1998).

Apesar de no presente estudo apenas uma banda de RISA ter sido identificada como Acidobacteria, sabe-se que esse grupo apresenta grande abundância no solo de matas de galeria. Em estudo metagenômico com 16S rDNA realizado por Araujo *et al.* (2012) no solo da mata de galeria do Pitoco foi encontrada predominância de OTUs (*operational taxonomic units*) pertencentes ao filo Acidobacteria (aproximadamente 45% do total). O segundo filo mais abundante foi Proteobacteria, com 40% das OTUs. Dentro desse grupo, as alfa-proteobactérias apresentaram maior representatividade no solo. Actinobacteria foi o quarto

filo mais abundante, representando cerca de 5% da diversidade bacteriana do solo. O filo Gemmatimonadetes também foi identificado no solo da mata de galeria, com uma representatividade de pouco mais de 1% da diversidade de bactérias

Como no presente estudo foram selecionadas bandas de RISA para o sequenciamento, o resultado obtido pode não refletir necessariamente a abundância relativa dos filos presentes no solo das matas de galeria, já que o número de bandas sequenciadas foi muito aquém do observado nos perfis de RISA. Adicionalmente, uma única banda pode representar mais de um grupo de organismos, o que aumentaria ainda mais a diversidade filogenética de bactérias encontradas no solo das matas. Apesar desse viés, o sequenciamento foi importante ao mostrar que, mesmo com poucos representantes da comunidade bacteriana sequenciados, uma grande diversidade de bactérias pode ser observada em solos de matas de galeria.

## **9. Conclusões**

Os resultados do presente trabalho, obtidos para as Matas de Galeria dos córregos Pitoco, Monjolo e Taquara, indicaram que a sazonalidade da precipitação característica do Cerrado é um fator importante para a dinâmica da diversidade bacteriana no solo dessa fitofisionomia florestal. O acompanhamento das comunidades de bactérias ao longo da sazonalidade da precipitação mostrou que mudanças na umidade do solo e em parâmetros químicos, como concentração de nutrientes, podem ser responsáveis pelas alterações encontradas nos perfis de RISA dessas comunidades. Adicionalmente, a avaliação da influência das transições entre estações sobre comunidades bacterianas do solo das Matas de Galeria indicou mudanças claras de sua diversidade em resposta a alterações nos teores de umidade do solo.

O experimento de adição de água na comunidade úmida da mata do Pitoco veio corroborar com os resultados obtidos nas transições entre estações. A simulação da primeira chuva no período de transição entre estações seca e chuvosa indicou resposta imediata dos perfis de RISA 16S-23S rDNA do solo à entrada de água após o longo período de seca. A solução obtida com a lixiviação da serapilheira que acarreta em entrada de nutrientes no solo com a primeira chuva é mais um fator que influencia a diversidade bacteriana no início da

estação chuvosa. No entanto, essa é uma resposta mais transitente, já que tende a cessar nas primeiras horas após a entrada dos nutrientes. Adicionalmente, mudanças nas concentrações de  $\text{N-NO}_3^-$  e  $\text{N-NH}_4^+$  podem indicar alterações no ciclo biogeoquímico do N logo após as primeiras chuvas da estação chuvosa, provavelmente por resultar em maior atividade microbiana no solo, como já visto por estudos anteriores.

O presente trabalho é, portanto, o primeiro a avaliar efeitos da transição entre estações seca e chuvosa sobre a comunidade bacteriana de solos de matas de galeria do Cerrado. Sua importância vem somar aos poucos trabalhos que objetivaram avaliar alterações na diversidade microbiana do solo em resposta às primeiras chuvas após longa estação seca. Corroborar ainda para uma melhor compreensão da influência da sazonalidade da precipitação sobre matas de galeria, ao indicar mudanças claras na comunidade bacteriana do solo, responsável por processos biogeoquímicos-chaves do ecossistema.

O gradiente topográfico das Matas de Galeria também foi visto por influenciar a diversidade em comunidades bacterianas do solo, principalmente na mata do Monjolo, mesmo após incêndio acidental das matas. Além da variação de umidade e de parâmetros químicos entre porções úmida e seca, a presença de comunidades florísticas distintas no decorrer do gradiente topográfico pode ter sido um fator importante para justificar as diferenças observadas na diversidade bacteriana do solo. As comunidades distintas floristicamente dentro de uma mesma mata de galeria, identificadas nos trabalhos de Silva Júnior (1995, 2001) também são distintas do ponto de vista dos processos de ciclagem biogeoquímica, como observado por Parron (2004) e, como observado no presente trabalho, apresentam distinção quanto à diversidade da comunidade bacteriana do solo.

Tanto as comunidades florísticas como os processos biogeoquímicos que ocorrem nos ecossistemas são intimamente relacionados à microbiota presente no solo. Apesar de mudanças na atividade, respiração e biomassa microbiana já terem sido exploradas em diversos ecossistemas que também apresentam topografia característica, a influência do gradiente topográfico de Matas de Galeria do Cerrado sobre comunidades microbianas ainda é pouco estudada. Mudanças na diversidade e composição bacteriana em função do gradiente topográfico são particularmente negligenciadas pela maioria dos estudos que se tem

conhecimento, mas são de extrema importância para uma melhor compreensão sobre a biodiversidade dos ecossistemas.

A topografia e sua influência na altura do lençol freático são determinantes na largura das Matas de Galeria. De acordo com Silva Júnior (2001) a comunidade úmida pode chegar aos 80m de distância das margens do córrego Monjolo (RECOR – IBGE), em seu trecho inicial mais plano, enquanto que a comunidade seca ocorre às margens do córrego Taquara (RECOR-IBGE), devido ao seu leito profundamente encaixado. Isso indica que os 30 m protegidos por Lei (nº 7.511/86 do Código Florestal), aplicáveis no caso das matas aqui consideradas, e a possível redução para apenas 15 m (Lei nº 1.876/99), não são suficientes para a proteção de toda a complexidade florística e estrutural encontrada nessas matas. Em algumas situações, dependendo da topografia da área, mesmo a comunidade úmida, geralmente mais próxima às margens dos córregos, seria apenas parcialmente protegida. O presente trabalho veio ainda somar informações importantes a respeito da efetividade do Código Florestal ao mostrar que a faixa de proteção determinada por Lei também não garante a preservação da biodiversidade das Matas de Galeria, inclusive de comunidades bacterianas presentes no solo. Essa fitofisionomia vem sendo cada vez mais afetada por distúrbios, a maioria deles de origem antrópica, e pouco se sabe sobre as consequências de tais distúrbios sobre a diversidade presente no ecossistema.

O incêndio acidental ocorrido ao final da estação seca de 2011 nas Matas de Galeria dos córregos Pitoco, Monjolo e Taquara foi uma oportunidade encontrada para estudar a resposta da microbiota a um distúrbio pouco associado a essa fitofisionomia. A passagem do fogo influenciou a diversidade da comunidade bacteriana. Pelos dendrogramas apresentados houve clara diferença entre perfis de RISA antes e após o incêndio. A concentração dos nutrientes e o pH do solo também foram alterados após a passagem do fogo, apresentando um provável efeito sobre a diversidade das comunidades bacterianas. Apesar de a literatura registrar aumentos da diversidade e composição em comunidades bacterianas após a passagem do fogo mesmo um mês (Yeager *et al.*, 2005) e um ano após o distúrbio (Smith *et al.*, 2008), seria importante o acompanhamento a longo prazo da dinâmica da diversidade bacteriana em solos das Matas de Galeria. Essa fitofisionomia florestal não é adaptada a queimadas

frequentes, mas mesmo assim vem sendo cada vez mais afetada por esse distúrbio e pouco se sabe sobre a recuperação da fauna, flora e da comunidade microbiana após sua ocorrência.

As triplicatas biológicas dos perfis de RISA obtidos nesse estudo apresentaram grande variação de similaridade entre si, independente da mata analisada. Apesar disso, agrupamentos de perfis em função de uma ou mais variáveis ambientais estudadas (sazonalidade da precipitação, gradiente topográfico e distúrbio causado pelo fogo) mostraram tendências claras que permitiram a corroboração das hipóteses inicialmente propostas.

Variações temporais e espaciais no teor de umidade e no pH (para o caso do período pós-fogo), assim como nas concentrações de nutrientes, como cálcio, potássio, fósforo e nitrogênio ( $\text{N-NO}_3^{2-}$  e  $\text{N-NH}_4^+$ ) podem ter influenciado as alterações na comunidade bacteriana observadas pelos perfis de RISA. No entanto, a análise de PCA não forneceu um padrão claro de agrupamento das amostras das diferentes matas em função de uma ou mais variáveis químicas mensuradas. Esse resultado pode ser um indício da complexidade e heterogeneidade das matas de galeria, mesmo dentro de pequenas faixas avaliadas, como os 50 metros dos transectos demarcados nas áreas. Adicionalmente, pode ser uma justificativa para a grande variação entre triplicatas dos perfis de RISA, já que comunidades bacterianas sofrem influência das características edáficas próprias do local em que se encontram.

Finalmente, os resultados obtidos com o sequenciamento mostraram dois grupos dominantes na composição das comunidades bacterianas: actinobactéria e proteobactéria. No entanto, a análise de alterações da composição foi restrita em função de algumas limitações da técnica de RISA e das dificuldades enfrentadas com o sequenciamento das bandas selecionadas nos perfis. Em um ambiente como o solo, o número máximo de diferentes fragmentos de DNA separados por técnicas de *fingerprint* é vastamente subestimado (Ibekwe *et al.*, 2001) e o padrão de bandas gerado é considerado como uma imagem da comunidade microbiana, refletindo as sequências de DNA mais abundantes. Adicionalmente, sequências diferentes podem co-migrar em posições idênticas e, em alguns grupos de microrganismos, a análise de sequência 16S-23S rDNA não permite a discriminação de espécies. No entanto, apesar dessas limitações, a técnica de PCR-RISA adotada no presente estudo permitiu diferenciar, temporal e espacialmente, populações de bactérias no solo.

## 10. Referências Bibliográficas

- Appel, T. 1998. Non biomass soil organic N - the substrate for N mineralization flushes following soil drying-rewetting and for organic-N rendered CaCl<sub>2</sub>-extractable upon soil drying. *Soil Biology and Biochemistry*, **30**: 1445-1456.
- Araujo, 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 the Brazilian savanna-like vegetation reveals Acidobacteria dominance. *Soil Microbiology*, DOI: 10.1007/s00248-012-0057-3.
- Atlas, R.M.; Bartha, R. 1998. *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*. Menlo Park, California: Addison-Wesley Longman.
- Austin AT, Vitousek PM (2000) Precipitation, decomposition and litter decomposability of *Metrosideros polymorpha* in native forests on Hawaii. *J Ecol* 88:129–138
- Austin, A.T.; Yahdjian, L.; Stark, J.M.; Belnap, J.; Porporato, A.; Norton, U; Ravetta, D.A.; Schaeffer, S.M. 2004. Water pulses and biogeochemical cycles in arid and semiarid ecosystems. *Oecologia*, **141**: 221-35.
- Austin, A.T. 2011. Has water limited our imagination for aridland biogeochemistry? *Trends in Ecology and Evolution*, **26**: 229-35.
- 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. *Soil Microbiology*, **60**: 453-461.
- Begon, M.; Townsend, C.R. & Harper, J.L. 2007. *Ecologia: de indivíduos a ecossistemas*. 4 ed. Porto Alegre: Atmed. 752 p.
- Belnap, J.; Phillips, S.L.; Miller, M.E. 2004. Response of desert biological soil crusts to alterations in precipitation frequency. *Oecologia*, **141**: 306-316.
- Belnap, J.; Welter, J.R.; Grimm, N.B.; Barger, N.; Ludwig, J. 2005. Linkages between microbial and hydrologic processes in arid and semi-arid water-sheds. *Ecology*, **86**: 298-307.

- Bamforth, S.S. 2007. Protozoa from aboveground and ground soils of a tropical rain forest in Puerto Rico. *Pedobiologia*, **50**: 515–525. DOI:10.1016/j.pedobi.2006.10.009.
- Bisset, J.; Parkinson, D. 1980. Long-term of fire on the composition and activity of the soil microflora of a subalpine, coniferous forest. *Canadian Journal of Botany*, **58**(15): 1704-1721.
- Borneman, J. & Triplett, E. W. 1997. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 2647-653.
- Bossio, D.A.; Girvan, M.S.; Verchot, L.; Bullimore, J.; Borelli, T.; Albrecht, A.; Scow, K.M.; Ball, A.S.; Pretty, J.N.; Osborn, A.M. 2005. Soil Microbial Community Response to Land Use Change in an Agricultural Landscape of Western Kenya. *Microbial Ecology*. **49**: 50-62.
- Botrel, R. T.; Oliveira-Filho, A.T.; Rodrigues, L.; Curi, N. 2002. Influência do solo e topografia sobre as variações da composição florística e estrutural da comunidade arbóreo-arbustiva de uma floresta estacional semidecidual em Ingaí, MG. *Revista Brasileira de Botânica*, **25**: 195-13.
- Bowden, W.B., McDowell, W.H., Asbury, C.E., Finley, A.M., 1992. Riparian nitrogen dynamics in two geomorphologically distinct tropical rain forest watersheds: nitrous oxide fluxes. *Biogeochemistry*, **18**: 77-99.
- Brandes, J.A., McClain, M.E., Pimentel, T.P., 1996. <sup>15</sup>N evidence for the origin and cycling of inorganic nitrogen in a small Amazonian catchment. *Biogeochemistry*, **34**: 45-56.
- Bresolin, J.D. 2006. Comparação da comunidade microbiana de solos sob vegetação nativa e sob diferentes sistemas agrícolas em áreas de plantio comercial na região central do Cerrado. Departamento de Ecologia, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil. Dissertação de Mestrado. 70p.
- 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 manoculture in the Brazilian Cerrado. *Brazilian Journal of Microbiology*. **41**: 391-403.

- Briones, A.M.; Okabe, S.; Umemiya, Y; Ramsing, N.B.; Reichardt, W.; Okuyama, H. (2003). Ammonia-oxidizing bacteria on root biofilms and their possible contribution to N use efficiency of different Rice cultivars. *Plant Soil*, **250**: 335-348.
- Butler, A.; Meir, P.; Saiz, G.; Maracahipes, L.; Schwantes, B.; Grace, J. 2011. Annual variation in soil respiration and its component parts in two structurally contrasting woody savannas in Central Brazil. *Plant Soil*, DOI 10.1007/s11104-011-0984-7.
- Carneiro, R.G.; Mendes, I.C.; Lovato, P.E.; Carvalho, A.M.; Vivaldi, L.J. 2004. Indicadores biológicos associados ao ciclo do fósforo em solos de Cerrado sob plantio direto e plantio convencional. *Pesq. Agropec. Bras.*, **39**(7): 661-669.
- Carney, K.M.; Matson, P. 2006. The influence of tropical plant diversity and composition on soil microbial communities. *Microbial Ecology*, **52**: 226-38.
- Castro, A. P.; Quirino, B. F.; Pappas Jr., G.; Kurokawa, A. S.; Neto, E. L. & Kruger, R. H. 2008. Diversity of soil fungal communities of Cerrado and its closely surrounding agriculture fields. *Archives of Microbiology*, **190**: 129-139.
- Certini, G. 2005. Effects of fire on the properties of forest soils: a review. *Oecologia*, **143**: 1-10.
- Chen, Y. 1998. Electron microscopy of soil structure and soil components. In: *Structure and Surface Reactions of Soil Particles* (eds P.M. Huang, N. Senesi & J.M. Bollag), pp. 155-182. John Wiley & Sons, New York.
- Chestnut, T.J., McDowell, W.H., 2000. C and N dynamics in the riparian and hyporheic zones of a tropical stream, Luquillo Mountains, Puerto Rico. *Journal of the North American Benthological Society*, **19**: 199-14.
- Chu, H.; Fujii, T.; Sho, M; Lin, X.; Yagi, K.; Hu, J.; Zhang, J. 2007. Community structure of ammonia-oxidizing bacteria under long-term application of mineral fertilizer and organic manure in a sandy loam soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**: 485-491.
- Chu, H.; Fujii, T.; Morimoto, S.; Lin, X.; Yagi, K. 2008. Population size and specific nitrification potential of soil ammonia-oxidizing bacteria under long-term fertilizer management. *Soil Biology & Biochemistry*, **40**: 1960-1963.

- Clark, J.S.; Campbell, J.H.; Grizzle, H.; Acosta-Martinez, V.; Zak, J.C. 2009. Soil microbial community response to drought and precipitation variability in the Chihuahuan Desert. *Microbial. Ecology*, **57**: 248-60.
- Collins, S.L.; Sinsabaugh, R.L.; Crenshaw, C; Green, L.; Porras-Alfaro, A.; Stursova, M.; Zeglin, L.H. 2008. Pulse dynamics and microbial processes in aridland ecosystems. *Journal of Ecology*, **96**: 413-420.
- Coutinho, L.M. 2002. O bioma do cerrado. In: *Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois*. Aldo Luiz Klein (Org.). Editora UNESP; Imprensa Oficial do Estado, São Paulo. pp. 77- 91.
- Crecchio, C., Gelsomino, A., Ambrosoli, R. Minati, J. L. E Ruggiero, P. 2004. Functional and molecular responses of soil microbial communities under differing soil management practices. *Soil Biology Biochemistry*. **36**: 1873-1883.
- Crutzen, P.J. & Goldammer, J.G. (Ed.). 1993. *Fire in the environment: the ecological, atmospheric and climatic importance of vegetation fires*. John Wiley & Sons Ltd.
- Curtis, T. P.; Sloan; W. T. & Scannell, J. W. 2002. Estimating prokaryotic diversity and limits. *PNAS*, **99**: 10494-10499.
- Davidson, E.A.; Matson, P. A.; Vitousek, P. M.; Riley, R.; Dunkin, K.; García-Méndez, G. and Maass, J. M. 1993. Processes regulating soil emissions of NO and N<sub>2</sub>O in a seasonally dry tropical forest. *Ecology*, **74**: 130–139.
- Davis, F.L.; Williams, S.T. 1970. Studies on the ecology of actinomycetes in soil. The occurrence and distribution of actinomycetes in a pine forest soil. *Soil Biochemistry*, **2**: 227-38.
- DeBano, L.F., D.G. Neary, and P.F. Ffolliott, 1998. *Fire's Effects on Ecosystems*. New York: John Wiley & Sons, Inc. 333 p
- Degens, B.P., Sparling, G.P. 1995. Repeated wet-dry cycles do not accelerate the mineralization of organic C involved in the macro-aggregation of a Sandy loam soil. *Plant Soil*, **175**: 197-03.
- Deka, H.K.; Mishra, R.R. 1983. The effect of slash burning on soil microflora. *Plant and Soil*, **73**: 167-175.

- DeLuca, T. H.; Zouhar, K. L. 2000. Effects of selection harvest and prescribed fire on the soil nitrogen status of ponderosa pine forests. *Forest Ecology Management*, **138**: 263–271.
- Devi, N.B.; Yadava, P.S. 2006. Seasonal dynamics in soil microbial biomass C, N and P in a mixed-oak forest ecosystem of Manipur, North-east India. *Applied Soil Ecology*, **31**: 220-27.
- Dijkstra, F.A.; Augustine, J.D.; Brewer, P.; Von Fischer, J.C. 2012. Nitrogen cycling and qater pulses in semiarid grasslands: are microbial and plant processes temporally asynchronous? *Oecologia*, DOI 10.1007/s00442-012-336-6.
- Dice, L.R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, **26**: 297-302.
- Doran, J. W.; Mielke, L. N.; Power, J. F. 1990. Microbial activity as regulated by water-filled space. Transactions 14<sup>th</sup> International Congress of Soil Science. Symposium III-3; *Ecology of Soil Microorganisms in the Microhabitat Environments III* – pp. 94-99.
- Douhan, G. W. & Rizzo, D. M. 2005. Phylogenetic divergence in a local population of the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum*. *New Phytologist*, **166**: 263-71.
- Eaton, W.D. 2001. Microbial and nutrient activity in soils from three different subtropical forest habitats in Belize, Central America, before and during the transition from dry to wet season. *Applied Soil Ecology*, **16**: 219-27.
- Eiten, G. 1972. The Cerrado vegetation of Brazil. *Botanical Review*, **38**: 201-341.
- Enkerli, J. & Widmer, F. 2010. Molecular ecology of fungal entomopathogens: molecular genetic tools and their applications in population and fate studies. *Biocontrol*, **55**: 17-37.
- Epstein, H.E.; Burke, I.C.; Lauenroth, W.K. 2002. Regional patterns of decomposition and primary production rates in the US Great Plains. *Ecology*, **83**: 320–327.
- Felfili, J.M. 1995. Diversity, struture and dynamics of a gallery forest in central Brazil. *Vegetation*, **117**:1-15.
- Felfili, J.M. 1997. Diameter and heigth distributions in a galery forest tree community and some of its main species in Central Brasil over a six year period (1985-1991). *Revista Brasileira de Botânica*, **20**:155-162.

- Felfili, J. M.; Nogueira, P. E.; Silva Jr., M. C.; Marimon, B. S. & Delitti, W. B. C. 2002. Composição florística e fitossociologia do cerrado sentido restrito no município de Água Boa – MT. *Acta Botânica Brasilica*, **16**: 103-112.
- Fisher, R.F.; Binkley, D. 2000. *Ecology and Management of Forest Soils*, 3rd ed. John Wiley and Sons Inc., New York, USA.
- Fierer, N.; Schimel, J. P. 2002. Effects of drying-rewetting frequency on soil carbon and nitrogen transformations. *Soil Biology and Biochemistry*, **34**: 777–787.
- Fierer, N.; Schimel, J.P.; Holden, P.A. 2002. Influence of drying-rewetting frequency on soil bacterial community structure. *Microbial Ecology*, **45**: 63-71.
- Fierer, N.; Breitbart, M.; Nulton, J.; Salamon, P.; Lozupone, C.; Jones, R.; Robeson, M.; Edwards, R. A.; Felts, B.; Rayhawk, S.; Knight, R.; Rohwer, F.; Jackson, R. B. 2007. Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**: 7059–66.
- Frangi, J.L. 1983. Las tierras pantanosas de la Montana puertorriquena. In: Lugo, A.E. Los bisques de Puerto Rico. USDA/Forest Service IITF and PR DNR, San Juan, Puerto Rico. pp. 233-47.
- Freckman, D.W.; Whitford, W.G.; Steinberg, Y. 1987. Effect of irrigation on nematode population dynamics and activity in desert soils. *Biology and Fertility of Soils*, **3**: 3-10.
- Fromin, N., Hamelin, J., Tarnawski, S., Roesti, D., Jourdain-Miserez, K., Forestier, N., Teyssier-Cuvelle, S., Gillet, F., Aragno, M. e Rossi, P. 2002. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology*, **4**: 634-643.
- Frost, P. G. & Robertson, F. 1987. The ecological effects of fire in savannas. In: *Determinants of Tropical Savannas*. B. H. Walker (ed.). IRL Press Limited, Oxford.
- Garbeva, P., veen, J. A. van e Elsas, J. D. van. 2004. Microbial diversity in soil: Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology*. **42**: 243-70

- Gilliam, J.W., 1994. Riparian wetlands and water quality. *Journal of Environmental Quality*, **25**: 896-900.
- Gordon, H.; Haygarth, P.M.; Bardgett, R.D. 2008. Drying and rewetting effects on soil microbial community composition and nutrient leaching. *Soil Biology and Biochemistry*, **40**: 302-311.
- Gregory, S.W.; Swanson, F.J.; McKee, W.A.; Cummins, K.W. 1991. Na ecosystem perspective of riparian zones. *BioScience*, **41**: 540-551.
- Gutknecht, J.L.M.; Goodman, R.M.; Balsler, T.C. 2006. Linking soil process and microbial ecology in freshwater wetland ecosystems. *Plant Soil*, **289**: 17-34.
- Haridasan, M.; Felfili, J. M.; Silva Jr., M. C.; Rezende, A. V.; Silva, P. E. N. 1996. Gradient analysis of soil properties and phytosociological parameters of some gallery forests on the Chapada dos Veadeiros in the cerrado region of central Brazil. p. 259-75. In: *Proceedings of the International Symposium on Assessment and Monitoring of Forests in Tropical Dry Regions with Special Reference to Gallery Forests*. November 4-7, 1996, Brasília, Brazil. University of Brasília, Brasília. 378p.
- Haridasan, M. 1998. Solos da mata de galeria e nutrição mineral de species arbóreas em condições naturais. In: Ribeiro, J.F. (Ed.) *Cerrado: matas de galeria*. EMBRAPA-CPAC, Planaltina, DF. pp. 12-8.
- Hart, S.C.; DeLuca, T.H.; Newman, G.S.; MacKenzie, M.D.; Boyle, S.I. 2005. Post-fire vegetative dynamics as drivers of microbial community structure and function in forest soils. *Forest Ecology and Management.*, **220**: 166-184.
- Head, I. M., W. D. Hiorns, T. M. Embley, A. J. McCarthy, and J. R. Saunders. 1993. The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. *Journal of General Microbiology*, **139**: 1147–1153.
- Hernani, L.C.; Sakai, E.; Lombardi Neto, F.; Lepsch, I.F. 1987. Influência de métodos de limpeza de terreno sob floresta secundária em latossolo amarelo do Vale do Ribeira, SP. II. Perdas por erosão. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, **11**: 215-19.

- Huang, P.M. & Bollag, J.M. 1998. Minerals –organics-microorganisms interactions in the soil environment. In: *Structure and Surface Reactions of Soil Particles* (eds P.M. Huang, N. Senesi & J.M. Bollag), pp. 3-39. John Wiley & Sons, New York.
- Hugenholtz, P.; Goebel, B. M.; Pace, N. R. 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*, **180**: 4765–4774.
- Hunt, J., Boddy, L., Randerson, P. F. e Rogers, H. J. 2004. An evaluation of 18S rDNA approaches for the study of fungal diversity in grassland soils. *Microbial Ecology*. **47**: 385-395.
- Huxman, T.E.; Smith, M.D.; Fay, P.A.; Knapp, A.K.; Shaw, M.R.; Loik, M.E.; Smith, S.D.; Tissue, D.T.; Zak, J.C.; Weltzin, J.F.; Pockman, W.T.; Sala, O.E.; Haddad, B.M.; Harte, J.; Koch, G.W.; Schwinning, S.; Small, E.E.; Williams, D.G. 2004. Convergence across biomes to a common rain-use efficiency. *Nature*, **429**: 651-654.
- Jamieson, W.D.; Pehl, M.J.; Gregory, G.A.; Orwin, P.M. 2009. Coordinated surface activities in *Variovorax paradoxus* EPS. *BMC Microbiology*, **9**: 124-132.
- Jenkinson, D.S. & Ladd, J.N. 1981. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. In: Paul, E.A. & Ladd, J.N., eds., *Soil Biology & Biochemistry*., **5**:415-471.
- Johnsen, K., Jacobsen, C. S., Torsvik, V. e Sorensen, J. 2001. Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils – a review. *Biology and Fertility of Soils*. **33**: 443-453
- Johnson, M. A.; Saraiva, P. M. & Coelho, D. 1999. The role of gallery Forest in the distribution of cerrado mammals. *Revista Brasileira de Biologia*. **59**: 421-427.
- Johnson, M.J.; Lee, K.I.; Scow, K.M. 2003. DNA fingerprinting reveals links among agricultural crops, soil properties and the composition of soil microbial communities. *Geoderma*, **114**: 279-303.
- Kang, S.; Mills, A.L. 2004. Soil bacterial communities structure changes following disturbance of the overlying plant community. *Soil Science*, **169** (1): 55-65.
- Keller, M.; Kaplan, W. A.; Wofsy, S. C. 1986. Emissions of N<sub>2</sub>O, CH<sub>4</sub>, and CO<sub>2</sub> from tropical forest soils. *Journal of Geophysical Research*, vol.11, DOI. 91:11791–11802.
- Kellman, M; Meave, J. 1997. Fire in the tropical gallery forests of Belize. *Journal of Biogeography*, **24**: 23-4.

- Kellman, M; Tackaberry, R; Rigg, L. 1998. Structure and function in two tropical gallery forest communities: implications for forest conservation in fragmented systems. *Journal of Applied Ecology*, **35**: 195-06.
- Kennedy, N & Clipson, N. 2003. Fingerprinting the fungal community. *Mycologist*. **17**:158-164.
- Khanna, P.K.; Raison, R.J. 1986. Effect of fire intensity on solution chemistry of surface soil under a *Eucalyptus pauciflora* forest. *Australian Journal of Soil Research.*, **24**: 423–434.
- Kirk, J.L.; Beaudette, L.A.; Hart, M.; Moutoglis, P.; Klironomos, J.N.; Lee, H.; Trevors, J.T. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, **58**: 169-188.
- Krashevskaya, V.; Sandmann, D.; Maraun, M.; Scheu, S. 2012. Consequences of exclusion of precipitation on microorganisms and microbial consumers in montane tropical rainforests. *Oecologia*, online, 22 de maio de 2012. pp. 1-10.
- Lauber, C.L.; Hamady, M.; Knight, R.; Fierer, N. 2009. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**: 5111-5120.
- Leff, J.W.; Nemergut, D.R.; Grandy, A.S.; O'Neill, S.P.; Wickings, K.; Townsend, A.R.; Cleveland, C.C. 2012. The effects of soil bacterial community structure on decomposition in a tropical rain forest. *Ecosystems*, **15**: 284-98.
- Leite, L.L. 1996. Densidade global e infiltração de água no solo em área de Cerrado submetida à queima controlada no DF, Brasil. In: MIRANDA, H.S.; SAITO, C.H.; DIAS, B.C.S. *Impactos de queimadas em áreas de Cerrado e restinga*. UnB, Brasília, p.31-36.
- Lensing, J.R.; Wise, D.H. 2007. Impact of changes in rainfall amounts predicted by climate-change models on decomposition in a deciduous forest. *Applied Soil Ecology* **35**: 523–534.
- Lima, W.P; Zakia, M.J.B. 2005. *Hidrologia de matas ciliares*. Disponível em: <<http://www.ipef.br/hidrologia/mataciliar.asp>>. Acesso em: 06/05/2012

- Linhares, A. A. 1995. Estimates of actinomycetes from Brazilian soils using the dispersion and differential centrifugation techniques, abstr. P1-3.1. *7<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology*. Winner Graph, São Paulo.
- Liu, W. T., Marsh, T. L.; Cheng, H.; Forney, L. J. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 4516–4522.
- Lloyd, P.S. 1972. Effects of fire on a derbyshire grassland community. *Ecology*, **53**: 915-920.
- Loik, M.E., Breshears, D.D.; Lauenroth, W.K.; Belnap, J. 2004. Multiscale perspective of water pulses in dryland ecosystems: climatology and ecohydrology of the western USA. *Oecologia*, **141**: 269-81.
- Lowrance, R., Altier, L.S., Newbold, J.D., Schnabel, R.R., Groffman, P.M., Denver, J.M., Correll, D.L., Gilliam, J.W., Robinson, J.L., Brinsfeld, R.B., Staver, K.W., Lucas, W., Todd, A.H., 1997. Water quality functions of riparian forest buffers in Chesapeake Bay watersheds. *Environmental Management*, **21**: 687-712.
- Lowrence, R.; Todd, R.; Fail Jr., J.; Hendrickson, O.; Leonard, R. & Asmussen, L. 1984. Riparian forests as nutrient filters in agricultural watersheds. *Bioscience*, **34**: 374-377.
- Luizão, R.C.C.; Luizão, F.J.; Paiva, R.Q.; Monteiro, T.F.; Sousa, L.S.; Kruijt. 2004. Variation of carbon and nitrogen cycling processes along a topographic gradient in a central Amazonian forest. *Global Change Biology*, **10**: 592-600.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., and Parker, J. 2000. *Brock Biology of Microorganisms*. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall.
- Maimaiti, J.; Zhang, Y.; Yang, J.; Cen, Y.P.; Layzell, D.B.; Peoples, M.; Dong, Z. 2007. Isolation and characterization of hydrogen-oxidizing bacteria induced following exposure of soil to hydrogen gas and their impact on plant growth. *Environmental Microbiology*, **9**(2): 435-444.
- Mallik, A.V.; Gimingham, C.H.; Rahman, A.A. 1984. Ecological effects of heather burning. I. Water infiltration, moisture retention and porosity of surface soil. *Journal of Ecology*, **72**: 767-776.

- Manfio, G. P. & Goodfellow, M. 1995. Diversity of *Streptomyces* in a tropical rain forest site: comparison of extraction methods, abstr. P2-0.8. *7<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology*. Winner Graph, São Paulo.
- Marshall, M. N.; Cocolin, L.; Mills, D. A.; Vanderghenst, J. S. 2003. Evaluation of PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities in compost. *Journal of Applied Microbiology*. **95**: 934-948.
- Matsuoka, M.; Mendes, I. C.; Loureiro, M. F. 2009. Biomassa microbiana e atividade enzimática em solos sob vegetação native e sistemas agrícolas anuais e perenes na região de Primavera do Leste (MT). *R. Bras. Ci. Solo*, **27**: 425-433.
- McClain, M.E., Richey, J.E., Pimentel, T.P., 1994. Groundwater nitrogen dynamics at the terrestrial-lotic interface of a small catchment in the Central Amazon Basin. *Biogeochemistry*, **27**: 113-127.
- McCulley, R.L.; Boutton, T.W.; Archer, S.R. 2007. Soil respiration in a Subtropical Savanna Parkland: response to water additions. *Soil Science Society of America Journal*, **71**(3): 820-828.
- McCune, B.; M. J. Mefford. 2006. *PC-ORD. Multivariate Analysis of Ecological Data*. Version 5.12 MjM Software, Gleneden Beach, Oregon, U.S.A.
- McDowell, W.H., Bowden, W.B., Asbury, C.E., 1992. Riparian nitrogen dynamics in two geomorphologically distinct tropical rain forest watersheds: subsurface solute patterns. *Biogeochemistry*, **18**: 53-75.
- McDowell, W.H., McSwiney, C.P., Bowden, W.B., 1996. Effects of hurricane disturbance on groundwater chemistry and riparian function in a tropical rain forest. *BioTropica*, **28**: 577-584.
- McGroddy, M.; Silver, W. L. 2000. Variations in belowground carbon storage and soil CO<sub>2</sub> flux rates along a wet tropical climate gradient. *Biotropica*, **32**: 614-624.
- Meirelles, M.L. 1990. Efeito do fogo sobre a umidade do solo em área de campo sujo de cerrado. *Ciência e Cultura*, São Paulo, **42**: 359-360.
- Meier, M. 1991. Nitratbestimmung in Boden-Proben (N-min-Methode). *LaborPraxis*, Würzburg, p. 244-47.

- Melo, I.S. 2002. Recursos genéticos microbianos. In: Melo, I.S.; Valadares-Ingles, M.C.; Nass, L.L.; Valois, A.C.C. (Ed.) *Recursos genéticos e melhoramento – microrganismos*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 743 p.
- Mendes, I.C. & Vivaldi, L.A. 2001. Dinâmica da biomassa e atividade microbiana em uma área sob Mata de Galeria na região do Distrito Federal. In: Ribeiro, J.F.; Fonseca, C.E.L. & Sousa-Silva, J.C. *Cerrado: caracterização e recuperação de Matas de Galeria*. EMBRAPA-Cerrados, Planaltina. pp. 665-687.
- Mendes, I.C.; Fernandes, M.F.; Chaer, G.M.; Reis Junior, F.B. 2012. Biological functioning of Brazilian Cerrado soils under different vegetation types. *Plant soil*, DOI: 10.1007/s11104-012-1195-6.
- Moreira, F.M.S; Siqueira, J.O. 2002. *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. Lavras: Editora UFLA. 626p
- Mulvaney, R. L. 1996. Nitrogen inorganic forms. In: Sparks, D. L. (Ed.). *Methods of soil analyses*. Madison: Soil Science Society of America, p. 1123-1184.
- Naiman, R.J., Decamps, H., 1997. The ecology of interfaces: riparian zones. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **28**: 621-658.
- Nannipieri, P.; Ascher, J.; Ceccherini, M.T.; Landi, L.; Pietramellara, G. E Renella, G. 2003. Microbial Diversity and Soil Functions. *European Journal of Soil Science*. **54**:655-670.
- Nardoto, G.B.; Bustamante, M.M.C. 2003. Effects of fire on soil nitrogen dynamics and microbial biomass in savannas of Central Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **38**: 955-962.
- Nardoto, G.B.; Ometto, J.P.H.B.; Ehleringer, J.R.; Higuchi, N.; Bustamante, M.M.C.; Martinelli, L.A. 2008. Understanding the influences of spatial patterns on N availability within the Brazilian Amazon Forest. *Ecosystems*, DOI: 10.1007/s10021-008-9189-1.
- Neary, D.G.; Klopatec, C.C.; DeBano, L.F.; Ffolliott, P.F. 1999. Fire effects on belowground sustainability: a review and synthesis. *Forest Ecology and Management*, **122**: 51-71.
- Nemergut, D. R.; Cleveland, C. C.; Wieder, W. R.; Washenberger, C. L.; Townsend, A. R. 2010. Plot-scale manipulations of organic matter inputs to soils correlate with shifts in

- microbial community composition in a lowland tropical rain forest. *Soil Biology and Biochemistry*, **42**: 2153–60.
- Neufeldt, H. 2006. Geocological drivers of cerrado heterogeneity and <sup>13</sup>C natural abundance in oxisols after land-use change. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, **30**(5): 891-900.
- Nicolaisen, M.H.; Ramsing, N.B. 2002. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, **50**: 189-03.
- Oliveira, C.A.; Marriel, I.E.; Gomes, E.A.; Lana, U.G.P.; Scotti, M.R.; Alves, V.M.C. 2009. Diversidade bacteriana da rizosfera de genótipos de milho contrastantes na eficiência de uso de fósforo. *Pesq. Agropec. Bras.*, **44**(11): 1473-1482.
- Parron, L.M.; Bustamante, M.M.C.; Prado, C.L. 2003. Mineralização de nitrogênio e biomassa microbiana em solos de Mata de Galeria: efeito do gradiente topográfico. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 25 p. (Embrapa Cerrados. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 88).
- Parron, L.M. 2004. Aspectos da ciclagem de nutrientes em função do gradiente topográfico, em uma mata de galeria no distrito federal. Departamento de Ecologia, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil. *Tese de Doutorado*. 180 p.
- Parron, L.M.; Bustamante, M.M.C.; Prado, C.L. 2004. Produção e composição química da serapilheira em um gradiente topográfico em mata de galeria no bioma Cerrado.. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 23 p. (Embrapa Cerrados. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 128).
- Parron, L.M.; Bustamante, M.M.C.; Markewitz, D. 2011. Fluxes of nitrogen and phosphorus in a gallery Forest in the Cerrado of central Brazil. *Biogeochemistry*, **105**: 89-104.
- Pett-Ridge, J.; Firestone, M.K. 2005. Redox fluctuations structures microbial communities in a wet tropical soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**: 6998-7007.
- Pereira, B. A. S.; Furtado, P. P.; Mendonça, R. C. & Rocha, G. I. 1989. Reserva Ecológica do IBGE (Brasília, DF): aspectos históricos e fisiográficos. *B. FBCN*, **24**: 30-43.
- Pereira, P. M.; Silveira, E. L.; Scaquito, D. C.; Pedrinho, E. A. N.; Val-Moraes, S. P.; Wicckert, E.; Carareto-Alves, L. M. & Lemos, E. G. M. 2006. Molecular

- characterization of bacterial populations of different soils. *Brazilian Journal of Microbiology*, **37**: 439-447.
- Pietikäinen, J.; Fritze, H. 1995. Clear-cutting and prescribed burning in coniferous forest: comparison of effects on soil fungal and total microbial biomass, respiration activity and nitrification. *Soil Biology and Biochemistry*, **27**: 101-109.
- Pinto, A. S.; Bustamante, M. M. C.; Kisselle, K.; Burke, R.; Zepp, R.; Viana, L. T.; Varella, R. F.; Molina, M. 2002. Soil emissions of N<sub>2</sub>O, NO and CO<sub>2</sub> in Brazilian savannas: Effects of vegetation type, seasonality and prescribed fires. *Journal of Geophysical Research*, **107**: 8089–8096.
- Pinto, L. V. A.; Davide, A. C.; Botelho, S. A.; Oliveira-Filho, A. T.; Machado, E. L. M. 2005. Distribuição das espécies arbóreo-arbustiva ao longo do gradiente de umidade do solo de nascentes pontuais da Bacia Hidrográfica do Ribeirão Santa Cruz, Lavras, MG. *Cerne*, **11**: 294-305.
- Pinto, A.S.; Bustamante, M.M.C.; Silva, M.R.S.S.; Kisselle, K.W.; Brossard, M.; Kruger, R.; Zepp, R.G.; 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**: 1-6.
- Puri, G.; Ashman, M.R. 1999. Microbial immobilization of <sup>15</sup>N-labelled ammonium and nitrate in a temperate woodland soil. *Soil Biology and Biochemistry*, **31**: 929-931.
- Quirino, B. F.; Pappas, G. J.; Tagliaferro, A. C.; Collevatti, R. G.; Neto, E. L.; Silva, M. R. S. S.; Bustamante, M. M. C. & Kruger, R. H. 2009. Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with soil of the savanna-like Cerrado vegetation. *Microbiological Research*, **164**: 59-70.
- Rab, M.A. 1996. Soil physical and hydrological properties following logging and slash burning in the Eucalyptus regnans forest of southeastern Australia. *Forest Ecology and Management*, **84**:159–175
- Ramos, A.E.; Rosa, C.M.M. Impacto das queimadas. 1996. In: Dias, B.F. de S. (Coord.). *Alternativas de desenvolvimento dos Cerrados: manejo e conservação dos recursos naturais renováveis*. Fundação Pró-Natureza, Brasília. pp.34-38.

- Reatto, A.; Coreia, J.R.; Spera, S.T.; Martins, E.S. 2008. Solos do bioma cerrado: aspectos. In: Sano, S.M. (ORG.). *Cerrado: ecologia e flora*. Embrapa Informações Tecnológicas, Brasília. pp. 107-149.
- Rezende, A. V.; Salgado, m. A. S.; Felfili, J. M.; Franco, A. C.; Sousa-Silva, J. C.; Cornachia, G. & Silva, M. A. 1998. Crescimento e repartição de biomassa em plântulas de *Cryptocaria aschersoniana* Mez. Submetidas a diferentes regimes de luz em viveiro. *Boletim do Herbário Ezechias Paulo Heringer*, Brasília, **2**: 19-33.
- Ribeiro, J. F. & Walter, B. M. T. 1998. Fitofisionomias do bioma Cerrado. In: Sano, S. M. & Almeida, S. P. (orgs.). *Cerrado: ambiente e flora*. EMBRAPA-Cerrados, Planaltina. Pp. 89-166.
- Ribeiro, J. F. & Walter, B. M. T. 2008. As principais fitofisionomias do bioma Cerrado. In: Sano, S.M.; Almeida, S.P. & Ribeiro, J.F. *Cerrado: ecologia e flora*. EMBRAPA-Cerrados, Brasília. Pp. 151-12.
- Rinklebe, J.; Langer, U. 2006. Microbial diversity in three floodplain soils at the Elbe River (Germany). **38**: 2144-151.
- Roesch, L. F. W.; Fulthorpe, R. R.; Riva, A.; Casella, G.; Hadwin, A. K. M.; Kent, A. D.; Daroub, S. H.; Camargo, F. A. O.; Farmerie, W. G. & Triplett, E. W. 2007. Pyrosequencing enumerates and contrast soil microbial diversity. *The ISME Journal*, **1**: 283-90.
- Salgado-Labouriau, M. L. & Ferraz-Vicentini, K. R. 1994. Fire in the Cerrado 32,000 years ago. *Current Research in the Pleistocene*. **11**: 85-87.
- Sampaio, A. B.; Walter, B. M. T. & Felfili, J. M. 2000. Diversidade e distribuição de espécies arbóreas em duas matas de galeria na micro-bacia do Riacho Fundo, Distrito Federal. *Acta Botanica Brasilica*, **14**: 197-14.
- Santos, D.; Bahia, V.G.; Teixeira, W.G. 1992. Queimadas e erosão do solo. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, **16**: 62-68.
- Schwinning, S.; Sala, O.E. 2004. Hierarchical organization of resource pulse responses in arid and semiarid ecosystems. *Oecologia*. DOI 10.1007/s00442-004-1520-8

- Silva, M.R.S.S. 2004. Produção de serapilheira, biomassa e diversidade de comunidades bacterianas do solo em áreas de Cerrado sob diferentes usos e manejos. Departamento de Ecologia, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil. *Dissertação de Mestrado*. 77p.
- Silva Júnior, M.C. 1995. Tree communities of the gallery forests of the IBGE Ecological Reserve, Federal District, Brazil. University of Edinburgh, *Tese de doutorado*, 257 p.
- Silva Júnior, M.C. 2001. Comparação entre matas de galeria no Distrito Federal e a efetividade do Código Florestal na proteção de sua diversidade arbórea. *Acta Botanica Brasilica*, **15**: 139-146.
- Silver, W.L.; Lugo, A.E.; Keller, M. 1999. Soil oxygen availability and biogeochemistry along rainfall and topographic gradients in upland wet tropical Forest soils. *Biogeochemistry*, **44**: 301-328.
- Silver, W. L., Herman, D. J.; Firestone, M. K. 2001. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium in tropical forest soils. *Ecology*, **82**: 2410–2416.
- Sneath, P.H.A.; Sokal, R.R. 1973. *Numerical Taxonomy, the principals and practice of numerical classification*. W.H. Freeman and Company, San Francisco. 573 pp.
- Singh, B.K.; Millard, P.; Whiteley, A.S.; Murrell, J.C. 2004. Unravelling rhizosphere-microbial interactions: oppotunities and limitations. *Trends in Microbiology*, **12**: 386-393.
- Smith, N.R.; Kishchuk, B.E.; Mohn, W.W. 2008. Effects of wildfire and harvest disturbances on forest soil bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**(1): 216-24.
- Srivastava, S.C.; Singh, J.S. 1991. Microbial C, N, and P in dry tropical forest soils: effects of alternative land-uses and nutrient flux. *Soil Biology and Biochemistry*, **23**: 117-124.
- Sharrow, S.H.; Wright, H.A. 1977. Effects of fire, ash, and litter on soil nitrate, temperature, moisture, and tobosagrass production in the rolling plains. *Journal of Range Management*, **30**: 266-70.
- Staddon, W.J.; Duchesne, L.C.; Trevors, J.T. 1996. Conservation of forest soil microbial diversity: the impact of fire and research needs. *Environmental Reviews.*, **4**: 267-75.
- Stark, J.M.; Firestone, M.K. 1995. Mechanisms for soil moisture effects on activity of nitrifying bactéria. *Applied and Environment Microbiology*, **61**: 218-21.

- Swift, M.J.; Heal, O.W.; Anderson, J.M. 1979. *Decomposition in terrestrial ecosystems*. University of California Press, Berkeley.
- Theng, B.K.G.; Tate, K.R.; Sollins, P.; Moris, N.; Nadkarni, N. & Tate III, R.L. 1989. Constituents of soil organic matter in the temperate and tropical soils. In: Coleman, D.C.; Oades, J.M. & Uehara, G., ed. *Dynamics of soil organic matter in tropical ecosystems*. Hawaii: University of Hawaii/ NifTAL Project. p. 5-31.
- Tsai, S.H.; Selvam, A.; Chang, Y.; Yang, S. 2008. Soil bacterial community composition across different topographic sites characterized by 16S rRNA gene clones in the Fushan Forest of Taiwan. *Botanical Studies*, **50**: 57-68.
- van den Berg, E.; Santos, F.A.M. 2003. Aspectos da variação ambiental em uma floresta de galeria em Itutinga, MG, Brasil. *Ciência Floresta*, **13**(2): 83-98.
- Varella, R. F.; Bustamante, M. M. C.; Pinto, A. S.; Kisselle, K. W.; Santos, R. V.; Burke, R. A.; Zepp, R. G.; Viana, C. T. 2004. Soil fluxes of CO<sub>2</sub>, CO, NO and N<sub>2</sub>O from an active old-pasture and from native savanna in central Brazil. *Ecological Applications*, **14** (4): 221–231.
- Vázquez, F.J.; Acea, M.J.; Carballas, R. 1993. Soil microbial populations after wildfire. *FEMS Microbiology Ecology*, **13**: 93-104.
- 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**: 1665-1672.
- Vitousek, P. M.; Matson, P. A. 1988. Nitrogen transformations in a range of tropical forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, **20**:361–367.
- Waksman, S. A.; Tenney, F. G.; Stevens, K. R. 1928. The role of microorganisms in the transformation of organic matter in forest soils. *Ecology*, **9**: 126-144
- Waldrop, M.P.; Balsler, T.C.; Firestone, M.K. 2000. Linking microbial community composition to function in a tropical soil. *Soil Biology and Biochemistry*, **32**: 1837-1846.
- Wieland, G.; Neumann, R.; Backhaus, H. 2001. Variation of microbial communities in soil, rhizosphere and rhizoplane in response to crop species, soil type and crop development. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**: 5849-5854.

- Williams, M.R., Fisher, T.R., Melack, J.M., 1997. Solute dynamics in soil water and groundwater in a central Amazon catchment undergoing deforestation. *Biogeochemistry*, **38**: 303-335.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial Evolution. *Microbiological Reviews*. **51**(2): 221-71.
- Yeager, C.M.; Northup, D.E.; Grow, C.C.; Barns, S.M.; Kuske, C.R. 2005. Changes in nitrogen-fixing and ammonia-oxidizing bacterial communities in soil of mixed conifer after wildfire. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**(5): 2713-722.
- 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**: 2042-050.
- Zhang, H.; Sekiguchi, Y.; Hanada, S.; Hugenholtz, P.; Kim, H.; Kamagata, Y.; Nakamura, K. 2003. *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum *Gemmatimonadetes* phyl. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **53**: 1155-1163.
- Zhou, J.; Xia, B.; Treves, D. S.; Wu, L. Y.; March, T. L.; O'Neill, R. V.; Palumbo, A. V. & Tiedje, J. M. 2002. Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**: 326-334.

**Anexo 1 - Tabela 6.** Análise de solos (0-10 cm de profundidade) das comunidades vegetais úmidas e secas das matas do Pitoco, Monjolo e Taquara, RECOR, Brasília - DF, nas estações seca e chuvosa e após queimada acidental em setembro de 2011. CTC: capacidade de troca catiônica; MO: matéria orgânica. Valores de desvio padrão são apresentados entre parênteses.

Parâmetros	Época de coleta	Pitoco		Monjolo		Taquara	
		Com. Úmida	Com. Seca	Com. Úmida	Com. Seca	Com. Úmida	Com. Seca
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/kg)	Estação Seca	1,29 (0,34)	1,80 (0,74)	1,89 (0,77)	1,91 (1,05)	2,24 (1,59)	1,10 (0,27)
	Estação Chuvosa	0,52 (0,67)	0,64 (0,21)	1,19 (1,05)	1,40 (0,20)	1,83 (0,45)	0,94 (0,16)
	Pós-fogo	5,96 (2,21)	3,23 (1,18)	5,72 (2,58)	4,51 (1,69)	3,77 (1,24)	2,80 (1,33)
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/kg)	Estação Seca	17,12 (3,29)	19,30 (2,04)	11,90 (0,35)	16,30 (5,99)	21,63 (6,68)	12,94 (0,57)
	Estação Chuvosa	48,68 (22,55)	44,52 (12,01)	49,64 (7,64)	44,43 (8,88)	65,93 (14,90)	37,66 (6,54)
	Pós-fogo	94,89 (75,60)	73,21 (36,44)	86,19 (57,82)	99,20 (93,19)	81,98 (39,75)	68,44 (1,22)
P (mg/dm <sup>3</sup> )*	Estação Seca	6,23 (0,86)	8,73 (4,36)	16,93 (19,97)	8,60 (6,56)	11,93 (8,59)	6,43 (3,14)
	Estação Chuvosa	4,93 (1,25)	4,57 (1,53)	4,87 (1,40)	9,80 (2,16)	4,97 (3,61)	6,00 (1,15)
	Pós-fogo	10,47 (4,80)	8,07 (3,58)	10,63 (2,23)	17,73 (7,96)	11,77 (10,00)	6,83 (3,21)
K (mg/dm <sup>3</sup> )*	Estação Seca	60,00 (8,66)	100,67 (20,20)	63,00 (21,51)	103,33 (21,36)	61,00 (25,98)	59,00 (16,70)
	Estação Chuvosa	51,00 (6,55)	70,00 (12,76)	53,67 (15,04)	95,33 (27,42)	35,00 (10,58)	38,00 (6,55)
	Pós-fogo	131,00 (36,51)	158,67 (11,02)	138,67 (24,68)	191,67 (39,58)	98,33 (50,50)	120,33 (13,05)
Ca <sup>2+</sup> (mg/dm <sup>3</sup> )*	Estação Seca	0,12 (0,01)	0,25 (0,08)	0,22 (0,09)	2,21 (2,04)	0,47 (0,03)	0,31 (0,06)
	Estação Chuvosa	0,13 (0,02)	0,19 (0,06)	0,19 (0,08)	2,36 (2,03)	0,20 (0,03)	0,22 (0,01)
	Pós-fogo	0,34 (0,06)	0,50 (0,08)	0,46 (0,15)	1,99 (1,27)	0,44 (0,19)	0,56 (0,06)
Mg <sup>2+</sup> (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )*	Estação Seca	0,18 (0,03)	0,36 (0,17)	0,31 (0,09)	1,47 (1,52)	0,47 (0,24)	0,31 (0,10)
	Estação Chuvosa	0,24 (0,06)	0,28 (0,16)	0,27 (0,06)	1,44 (1,24)	0,28 (0,15)	0,20 (0,02)
	Pós-fogo	0,18 (0,03)	0,32 (0,13)	0,24 (0,07)	0,83 (0,67)	0,23 (0,15)	0,24 (0,04)
Al <sup>3+</sup> (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )*	Estação Seca	2,37 (0,92)	2,37 (1,08)	2,93 (0,17)	1,66 (1,54)	2,67 (1,46)	2,67 (0,37)
	Estação Chuvosa	2,96 (1,00)	2,25 (0,84)	2,21 (0,59)	1,66 (1,50)	2,18 (1,13)	2,05 (0,33)
	Pós-fogo	2,53 (0,55)	2,10 (0,62)	1,70 (0,46)	1,20 (1,21)	1,93 (0,76)	2,00 (0,87)
CTC (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )*	Estação Seca	2,83 (0,91)	3,24 (0,99)	3,63 (0,31)	5,60 (2,30)	3,61 (1,29)	3,49 (0,57)
	Estação Chuvosa	3,46 (1,03)	2,89 (0,75)	2,81 (0,51)	5,71 (1,94)	2,75 (1,00)	2,56 (0,36)
	Pós-fogo	3,38 (0,68)	3,33 (0,50)	2,75 (0,49)	4,51 (1,70)	2,86 (0,54)	3,11 (0,86)
MO (dag/kg)*	Estação Seca	22,66 (7,64)	20,43 (8,26)	13,93 (3,04)	24,72 (7,06)	22,09 (12,00)	18,93 (7,68)

Estação Chuvosa	22,88 (8,01)	18,04 (10,13)	11,17 (2,00)	24,02 (0,38)	14,69 (9,15)	12,50 (2,49)
Pós-fogo	20,98 (5,71)	16,52 (3,27)	15,54 (6,32)	35,00 (1,64)	18,41 (12,29)	33,04 (0,47)

---

**P, K - Extrator Mehlich 1; Ca, Mg, Al - Extrator KCl (1 mol/l) \*Análises realizadas no Laboratório de Análise de Solos, Universidade Federal de Viçosa**

## ANEXO 2

### B1 –

GGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGTTGGATCACCTCCTTTCTAAGGAGCATCTCGG  
CCGCCGTTTGGTGGTCCAGAGGCCATTGCGCAGGCGTGGGTCCCTGCGGTGGTTTG  
CTCATGGGTGGAACGTTGGCTATTCGGCACGGTTGGTGAGGGTTCGTTAGTACTGC  
TTCGGCGTGGAAGGCGGATCGGATCTGGTTCGGGTCGGGCCCGTTGTTGGGTCCTG  
AGGGTGCGGGAGTTTTTTCCTGTTCCCTCTGGTG

### B2–

CGCTGCGCCACCCGTAAGGGGGGCAGGCGCCACGGTATGGTTCGGTGATTGGGGT  
GAAGTCGTAACAAGGTAGCTGTAGGAGAACCTGTGGCTGGATCACCTCCTTTCTA  
AGGAGTCCACAGGGTCTGTACCCCGCCTCGATTGTGTGCCTACCTAGTCTTCAGGG  
AGCCACCCGTCGCGCTCGTTGGCGGGCGGATGCTCCTTGGCAACCGACCTCATCC  
GCGGAGGACGTGCTTTCGGCCTCATGTGGCACCACGGGCCTATAGCTCAGTTGGC  
TAGAGCGCACGGCTGATAACCGTGAGGTCAGTGGTTCAAATCCACTTAGGCCAC  
CATGACCTCGCCGTCGGGGCTGTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCGCCCTTGCAAGG  
CGGAGGTCGCCGTTTCGAACCCGGTCAGCTCCACCAACCCGCGGAGAAGAGACG  
CCAGCGGTGCATCATTCCCTACGGAATGCTCGATCGGTGGCGTTTCCCTGAGGA  
ATCGTCACGGCGGGCCACTGAGCCCGCGGTTCAATTGACAACCGAAGATCCTGATT  
TAGTTGTAGGGCATCGATAGCCGACTACACGTGTTTCAAGCAGTGTAACGTTGT  
GGTCAAGCTACTAAGGGCGTACGG

### B3–

CCCGTAAGGGAGGGAGCCGTCGAAGGTGGGGTCGGCGATTGGGACGAAGTCGTA  
ACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTAAGGAGCACC  
TGGCGCGGTCCCTTCGGGAT

### B4 –

ACCCGCAAGGGAGGGAGCCGTCGAAGGTGGGGTCGATGATTGGGGTGAAGTCGT  
AACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTAAGGAGAAA  
TCGGGCGTTGCGGCGGCCTACGGCGTGAGCCGTAGCGTCCCCGAGCGGTGGGGGA  
GCCCTCCCGGATCCGCGAGGAAACGGGAGGGTGCGCCGCTGACGCCTTTGTCGCA  
CCCCTTGCCACTACCAGGTTTGCTTCCGGGGGGCCTCGCAGGGCTCGCTTTTTATT  
GCCTGCGCGGCCCGCCCGGAAGGGCGCACCTTGATAACTGCATAACGTCGGGTC  
GTGTACGCCGTTTCCAAGGCGGGTTCGTGTGCGATCGTGCAATCTCTATACAGCTA  
CTCCTAAGGTTGTAAAGCTTCAAGCTAGAAAGGGCGCACGG

### B5 –

ACTCGCTATGCAGTTCTCAAGGTGCCGTTGATTGGAGCGCGAGGAGCCCACGGGC  
GAACCCGGGGCGACAGGCAGAGCGGCTGCCATCGAAAGATGGCAGCCGTGGACG  
CTCCCTCAAAGCGGAAGAAAGGACGAAAGTCAGTGACCAACTGGGAGTCGGGT

GATCAATCGAGGCGTGTGCCTCGGTGTCACCCTGGGTGACTCCTTAAAAAGGAGG  
TGATCCAGCCGCACCTTCCGGTACGGCTACCTTGTTACGACTTCACCCCAATCGCT  
AACCCACCTTCCACGGCTCCCTCCCAAAGGGTTGGGCCACCGGCTTCGGGTGTTG  
CCAACCTTCGTGG

**B6-**

AGCATGTGATCCAGCCCGACCTCCCCTAACTCGATGATGACCACCGCGGTGTTGG  
CCATCTCCGGATCGCGCACCGTGCGATTGAGCAGGGTGGTTTTTCCGCTGCCGA

**B7 -**

CCGGTGGCCTAACCCGCAAGGGAGGGAGCCGTCCAAGGTGGGGTCGATGATTGG  
GGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTT  
CTAAGGAGAAATCGGGCGTTGCGGCTCCCCGAGCGGTGGGGGAGCCCTCCCGGAT  
CCGCGAGGAAACGGGAGGGT

**B8 -**

GCTTTATCTTTATTCGTTCAAATACTAACATACTAAGTTTACACCCCCGCATGTG  
TCTCCTCTTTACAGTCAATATTTTTACAGGAAATATTTTTTTTTCTTTTTATAGCCGC  
ATTTAGACAATCTGTGTGGACACATCACAATACGTCTCTTTTTCGGTAAGGAGGTGT  
TCCAACCACAGGTTCCCCTACGGTTACCTTGTTACGACTTCACCCCGGTCATTAAT  
CACAAAGTTGTAAGCGCTCCCCCGTAAGTTAAGCTACCTACTTATTTTGCAACCCA  
CTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTGCAA

**B9 -**

AGGGAGGGAGCCGTCCAAGGTGGGGTCGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGG  
TAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTAAGGA

**B10 -**

TCTACGATTCGTAGAGTTTGCCCATCAATATTCAATTGTCCACTACCTCAATTGCG  
TCATCGGACTGCAACGTCCGTCAACGCGCAAGAAAGAGGGAAGAAACCACACGA  
AGCACAAAATGCACATGAGCTTCTTGTCCTCTTGGGGTTCCTTCTTCTTCTCAGT  
GGAGATGATCGGGTTCGAACCGACGGCCTCCGCAGTGCAAGTGCGGGCGCTCTCC  
AACTGAGCTACATCCCCCTACCCAAACCCTCTTAC

**B11 -**

TCGGTGTGTTCCCTAACACCACTACACCACGCACTCGTCAGTTTTCAAAGAGCAGA  
AACAGAGACAAAAAAAATCCCTGACCGAAAAAGAATCGATGATCGAGTGTGGA  
AAGTGCGGGCGACTCTCGAGGCCTTTCGTGCGCGGGCAAGCCGCGCAGTTACTCG  
GCGCTCCAGAAAGGAGGTGATCCAGCCGCAGGTTCCCCTACGGCTACCTTGTTAC  
GACTTCGCCCCAGTCACCGACTTGACCTTAGACGGCTGCCCCCTTGC GGTTGGCCC  
ACCGGTTTCGGGTCCCTCCGGCTTCCATGGCGTGACGGGCGGTGTGTA

**B12-**

TTGCCCGCGCGCTTTTGCCCGTGACGCGTGGTGGAGCTGATCGGGTTCGAACCGAT  
GACCCCGGCTTGCAAAGCCGG

**B13 –**

ACAACCGAAGACCAAACCGCTCACGCGGCCGTGCCCTCAGACACCCAACAACGT  
GCCATACCAAACAAAAGCGCCGATGTTCCACCCATGAGCAAGCACTCACACACGT  
TCGGCGCGAGCTGCTATGTGCTCCTTAGAAAGGAGGTGATCCAGCCGCACCTTCC  
GGTACGGCTACCTTGTTACGACTTCGTCCCAATCGCTGGTCCCACCTTCGACGGCT  
CCCCCACAAGGGTTGGGCCACCGGCTTCGGGTGTTACCGACTTTCGTGACGTGA  
CGGGCGGTGTGTG

**B14 –**

GCGTGTTCTTTGCATTGGTTACCCTAAATTACTTTCTTCGCTATTCGATTTTGAAGG  
TACATGTGCGGGCGCGAGGCCGGGCATCGATGATACCCACCAGGCGGGCGCTTTCT  
AACACATGGAGATGACCAGATTCGAACTGGCGACCCCCTGCTTGCAAAGCAGGTG  
CTCTCCCAGCTGAGCTACATCCCCAAATGGGATCTCTTCACTTGAGATCGTCATCG  
TTTGGCCGGCAACGTCACGCTCTGGGCACCAGCGG

**B15 –**

AAGGTATGACTGGTGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCT  
GTGGCTGGATCACCTCCTTTCTAAGAGTGTTCATCATGGGCTTCGGTCCGTGGGT  
CAATGTGATTCGCGCGACTCTTGACGAGATTCGAGTCTGGCTTCTGTACGTTTTCT  
GCCTCAAATTTTCCGATTATCCCAAAGAACGCCATCGGGCCTGTAGCTCAGGT  
GGTTAGAGCGCACGCCTGATAAGCGTGAGGTCGGTAGTTCAACTCTACCCAGGCC  
CATGTTAGTGAAGAGGGTTGGGTAGGGGGATGTAGCTCAGTTGGGAGAGCGCCGC  
ACTTGCACTGCGGAGGCCGTTCGGTTCGAACCCGATCATCTCCACTGAGAAAGAAG  
AAGGAACCACAAGAGGCACAAGAAGCTCATGTGCATTTTGTGCTTCTTGTGGTTT  
CTTCCCTCTTTCTTGCGCGTTGACGGACGTTGCAGTCCGATGACGCAACTG

**B16–**

CACTGTGCAGTTCTCAAACAACGACCGAAGACCAAACCGCCTCACAGCGGCCGTG  
CCCTCAGACACCCAACAGCGTGCCATACCAAACCTTGAAGCGTCGATGTTCCACC  
CATGAGCAAGCACTCGCACACGTTCCGGCCCGAGCTGCCATGTGCTCCTTAGAAAG  
GAGGTGATCCAGCCGCACCTTCCGGTACGGCTACCTTGTTACGACTTCGTCCCAAT  
CGCTGGTCCCACCTTCGACGGCTCCCCCACAAGGGTTGGGCCACCGGCTTCGGG  
TGTTACCGACTTTCGTGACGTGACGGGCGGTGTGTGCAA

**B17–**

GCAGTTCTCAAACAACGACCGAAGACCAAACCGCCTCACAGCGGCCGTGCCCTCA  
GACACCCAACAGCGTGCCATACCAAACCTTGAAGCGTCGATGTTCCACCCATGAG  
CAAGCACCCAGGGACGTTCCGGCCCGAGCTGCCATGTGCTCCTTAGAAAGGAGGTG  
ATCCAGCCGCACCTTCCGGTACGGCTACCTTGTTACGACTTCGTCCCAATCGCTGG  
TCCCACCTTCGACGGCTCCCCCACAAGGGTTGGGCCACCGGCTTCGGGTGTTACC  
GACTTTCGTGACGTGACGGGCGGTGTGTACAA

**B18 –**

CTCAACCTGCTGAAGATTCCGCTCGAGTAGGCCGGCCAAGCCCAACAATATAAGG  
AGAATAAACGCTAGATGTTGCACATGATCGGACACGCCCTTTTCGGGTTGATCAT  
CGGTCTGCTGGCCCGTGCCATCATGCCCGGCCGGCACCACATGGGCCTGATAATG  
ACTATGATTCTTGGTCTCGTGGGTGCGTGGCTCGACGGCTCGATCGGCCGAATGAC  
CGGCATGTACCAGGAGGGCCACCCGGCGGGGTGGTTCATGGCGCTCTTCTTCTCC  
CTAATCTGACTGTTTAGTTACACGCGTGCAATTGGGTGATTCAGCAGGTTGAGCTT  
TCCGTTCTGTACCTCTACGGACTGCGTGCTCTGCTTGCCGTTCTTCTCCACGGTGAC  
GTTGTAGGTGCCGGGCGGCAGCGGGATACGGGCGGTGTGTACAAA