

BIOINDICADORES DA QUALIDADE DO SOLO EM UMA CRONOSEQUÊNCIA DE RESTAURAÇÃO AMBIENTAL

Aluno: Rafael Leandro de Figueiredo Vasconcellos

Orientadora: Profa. Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso

Resumo

Alterações ambientais podem interferir nas características da biomassa microbiana, no processo de ciclagem de nutrientes, nas características físicas e também na diversidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e da mesofauna. Os FMA são importantes para manter um solo saudável. São responsáveis pela melhoria da agregação do solo, pelo o aumento da absorção de nutrientes pelas plantas, estimula as bactérias fixadoras de nitrogênio, aumenta a concentração de carbono no solo e ainda podem servir como nutrientes para a mesofauna. A mesofauna não é diferente, são em conjunto com a microbiota edáfica responsáveis pela decomposição da matéria orgânica pela ciclagem de nutrientes e são vistos como dispersores de FMAs no ambiente. Assim, com intuito de conhecer melhor as características do desenvolvimento dessa rede de interações biológicas, foram selecionadas três áreas com estágios diferentes de recuperação (4, 8 e 20 anos) as quais serão comparadas com uma floresta Estacional Semidecídua nativa intacta a partir dos atributos físicos, químicos e biológicos. Pode-se assim, conhecer as diferentes interações entre estes atributos e identificar potenciais bioindicadores da qualidade do solo ou do tempo de recuperação. Com este conhecimento pode-se, gerar estudos pouco explorados no Brasil, e desenvolver métodos para acelerar a recuperação ambiental.

1 Introdução e Justificativa

O solo é um sistema biológico dinâmico e complexo, em que diferentes organismos desempenham papéis fundamentais para a manutenção e a sobrevivência de comunidades vegetais e animais nos ecossistemas terrestres. Esta qualidade edáfica pode ser definida como a capacidade de funcionamento do solo, dentro do ecossistema e das limitações de uso que permite a sustentabilidade biológica e favorece a manutenção e o crescimento de plantas, de animais e do homem (Doran & Parkin, 1994; Frighetto & Valarini, 2000).

Neste sistema biológico os microrganismos possuem papel fundamental na manutenção das condições saudáveis do solo sendo responsáveis pelos processos biológicos e bioquímicos do solo como a fixação do N₂, a nitrificação, a mineralização da matéria orgânica do solo, a amonificação, simbioses com vegetais, as quais podem proteger as plantas, estimular absorção de nutrientes e favorecer o crescimento das mesmas, são de fundamental importância na recuperação dos solos degradados e na manutenção da qualidade e produtividade dos solos (Catellan, 1989).

Os microrganismos do solo podem ainda exercer efeito sobre a macrofauna edáfica e explicar os processos edáficos que ocorrem em Florestas (Baretta, 2007), regulando a decomposição e a ciclagem de nutrientes (Lavelle et al., 1992; Lavelle et al., 2006).

No solo, após a degradação pelas diferentes ações do homem, parte da diversidade biológica pode ser perdida e assim ocorrer desestruturação do ecossistema edáfico. No entanto, de acordo com a teoria da resiliência (Moreira & Siqueira, 2006), o ambiente tem capacidade de voltar às suas condições normais. Soma-se, a este conceito, a idéia da redundância em que diferentes espécies possuem funções semelhantes no ambiente. Assim, o ecossistema se mantém inalterado se os principais grupos funcionais são mantidos e sustentam a proporção entre biomassa, produtores primários, consumidores e decompositores (Lawton and Brown, 1994; Tilman and Downing, 1994).

Ehrlich & Ehrlich (1981) citado em Yan et al.(2000) sugerem a “rivet hypotheses” ou hipótese do rebite em que a perda de grupos principais pode desencadear toda a desestruturação do sistema. Nesta hipótese, apesar de existirem graus de redundância entre as espécies, a perda da diversidade pode comprometer todo o funcionamento do ecossistema. Dessa forma, as espécies não são iguais no ecossistema e algumas são mais importantes que outras no contexto de manutenção da qualidade edáfica e assim, o ecossistema edáfico pode tolerar a perda de espécies até um limite crítico (Ehrlich & Wilson, 1991).

O número e a atividade desses grupos funcionais microbianos do solo são influenciados por fatores físicos (temperatura, umidade, aeração, luz), fatores químicos (pH, disponibilidade de nutrientes, salinidade, etc.) e fatores biológicos (competição, associação, antagonismo, parasitismo, etc) que por sua vez sofrem modificações em função da forma de uso e manejo do solo (Tsai et al., 1992; Yan et al., 2000; Mariani et al., 2006). Portanto, é fundamental estudar os grupos microbianos do solo e relacioná-los com atributos físicos, químicos e outros atributos biológicos para se determinar os principais ou mais importantes grupos funcionais do solo. Sendo um bioindicador definido como uma espécie, família ou grupo funcional que reage de modo específico a certos tipos de mudanças ambientais (Paoletti & Bressan, 1996; Paoletti, 1999). A sensibilidade da microbiota do solo, as modificações dos atributos químicos e físicos do

solo, os seus parâmetros microbiológicos e bioquímicos são apontados como bioindicadores potenciais da qualidade do solo (Pankhurst et al., 1995).

A qualidade do solo é verificada pela interação dos três atributos: biológicos, químicos e físicos. Infiltração e escoamento superficial de água, aeração e também a capacidade de promover o desenvolvimento radicular são condições que definem a qualidade do solo devido às modificações dos atributos físicos (densidade do solo, agregados, porosidade) (Dexter, 2004). A textura é uma das principais propriedades do solo e controla a água, nutrientes e oxigenação. A porosidade é outro fator importante, pois está relacionada à capilaridade de modo que a modificação nessa pode interferir no equilíbrio entre ar/água. A composição dos agregados do solo também é descrita como indicadora da qualidade do solo sendo relacionada com o crescimento radicular e com o balanço água e ar. A estrutura do solo caracterizada pela forma e tamanho dos agregados tem relação direta com a matéria orgânica do solo e outros atributos químicos.

Esses atributos químicos ainda possuem interação com os atributos biológicos do solo os quais estão relacionados com os ciclos biogeoquímicos e com a decomposição da matéria orgânica (Schoenholtz et al. 2000; Marinari et al 2006; Baretta et al 2008a; Baretta et al 2008b). Por outro lado, algumas propriedades químicas possuem interferência na qualidade biológica do solo principalmente pela disponibilidade de nutrientes como nitrogênio e fósforo e também fontes de carbono. Somando-se a matéria orgânica com a disponibilidade de nutrientes do solo com os atributos biológicos e com os processos físico-químicos, se determina a capacidade do solo em disponibilizar e reter nutrientes e água. A água, por sua vez, influencia a redistribuição de nutrientes e também a sua lixiviação (Schoenholtz et al. 2000). Assim a sensibilidade da microbiota do solo às modificações dos atributos químicos e físicos do solo podem ser apontados como bioindicadores potenciais da qualidade do solo (Pankhurst et al., 1995).

Devido aos avanços das técnicas moleculares, bioquímicas e fisiológicas para o estudo de comunidades microbianas dos solos, tornou-se possível avaliar a diversidade, composição e funcionamento destas comunidades complexas e sua variabilidade em ambientes naturais e impactados (Leckie, 2005). Essa diversidade funcional da microbiota pode ser determinada pela diversidade genética e está associada à ocorrência de processos essenciais para a manutenção de sua qualidade do solo. Assim, é plausível

supor-se que a diversidade genética pode ser usada como indicadora da qualidade dos solos (Lambais et al., 2005), permitindo o entendimento da complexidade da ligação entre diversidade microbiana e suas funções no solo e a compreensão das relações entre diversidade genética e estrutura de comunidades (Nannipieri et al., 2003).

A maioria das bactérias obtidas de amostras ambientais não pode ser cultivada em meios artificiais (Amann et al., 1995), incorrendo no fato de que apenas pequena porção da comunidade microbiana é avaliada. Estima-se que de 80 a 99 % dos microrganismos do solo permaneçam sem identificação (Alexander, 1977).

O emprego de técnicas de DNA recombinante, usando a reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar genes comuns a todos os organismos, possibilita a identificação daqueles até agora desconhecidos. Várias técnicas baseadas na amplificação de regiões do DNA, aleatória ou específica, foram desenvolvidas com o desenvolvimento da técnica da PCR e permitem melhor discriminação de microrganismos. O gene comumente amplificado para esse propósito entre os procarionotes é o que codifica a região 16S do RNA ribossômico (Woese, 1987).

O seqüenciamento dessa região e a comparação com banco de dados existentes têm revelado grande número de microrganismos nunca antes conhecidos (Bornemann & Triplett, 1997). A técnica do DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis), empregada após obtenção de ácidos nucléicos do ambiente, também permite a identificação da estrutura da comunidade microbiana do solo, pelo padrão diferencial de bandas em gel de acrilamida desnaturante (Nakatsu et al, 2000; Kozkroj & Van Elsas, 2000). A identificação desses organismos pode ser obtida pela extração dessas bandas do gel, clonagem do DNA, seqüenciamento e comparação das seqüências e bancos de dados públicos como o GenBank.

Outra forma de encontrar os diferentes grupos funcionais da técnica de T-RFLP (Terminal Fragment Length Polymorphism) a qual é uma metodologia desenvolvida para analisar diferenças polimórficas entre seqüência de DNA a partir de análise de produto de PCR com *primers* marcados com fluorescência. Pode ser utilizado para em diversos ambientes inclusive no solo (Osborn et al 2000; Blackwood et al 2003). Este método revela o padrão de bandas de DNA apresentado em um gel de agarose. O número, a posição relativa de migração e a intensidade das bandas específicas nos padrões podem ser quantificados e interpretados segundo a estrutura de comunidade microbiana no solo (Widmer et al., 2001).

A participação da microbiota do solo também pode ser avaliada a partir da biomassa microbiana e a respiração basal as quais têm sido os parâmetros mais adotados como bioindicadores de alterações no solo (Chodak et al., 2008). Alguns trabalhos sugerem que aumentando o conteúdo de carbono orgânico e a biomassa microbiana pode ocorrer um aumento da diversidade funcional microbiana e assim pode melhorar a funcionalidade e a estabilidade do ecossistema edáfico (Yan et al., 2000; Degens et al., 2001). Alguns processos de restauração do solo podem demorar mais de vinte anos para atingir as características como biomassa e diversidade microbiana de um solo não perturbado (Insam & Domsch, 1988; Mummey *et al.*, 2002b; Graham & Haynes, 2004; Chodak *et al.*, 2008). Dessa forma, é fundamental encontrar os principais indicadores da qualidade do solo para conhecer melhor o processo de recuperação e assim criar condições favoráveis a uma aceleração dessa restauração ambiental.

Além dos diferentes grupos funcionais microbianos do solo destacam-se também os fungos micorrizicos arbusculares (FMAs), os quais possuem papel fundamental na manutenção das condições ambientais do solo. Os FMAs formam simbioses através de associações micorrízicas e, além de garantir suprimento de carboidratos e lipídeos aos fungos, favorece a absorção de nutrientes pelas plantas (Bago et al., 2003).

A exsudação das plantas micorrizadas pode ser ainda, entre 4 a 20 % superior a das plantas não micorrizadas e pode estimular um incremento de carbono do solo estimado em 5 bilhões de toneladas por ano (Douds et al., 2000; Graham, 2000). A extensa rede de hifas formada pelo fungo micorrízico no solo ajuda consideravelmente a planta na exploração de nutrientes minerais e água do solo, contribuindo muitas vezes para um aumento em sua taxa de crescimento (Marschner; Baumann, 2003). Também, contribuem com o desenvolvimento das plantas ao amenizar os efeitos tóxicos causados por metais pesados presentes no solo (Nogueira et al., 2004).

Essas hifas externas se emaranham às partículas de areia, silte e argila, formando macroagregados mais estáveis, aumentando a resistência do solo à erosão (Ryan; Graham, 2002). Além disso, a produção de glomalina pelos FMA também interfere nas características físicas do solo, influenciando principalmente a agregação e, portanto, a qualidade desse solo (Rillig, 2004). Além disso, os FMAs formam interação com bactérias fixadoras de nitrogênio, como as diazotróficas, o que pode ajudar na ciclagem de nutrientes e na melhora das condições nutricionais do solo (Miyachi et al. 2008).

Com isso, esses FMAs têm sido inclusive utilizados na recuperação de áreas degradadas (Allen, 1989).

A cobertura vegetal no processo de recuperação ambiental quando feita com plantas micorrizadas pode favorecer a introdução ou a re-introdução de espécies nativas (Allen & Allen, 1988; Allen, 1989; Rao & Tak, 2001; Barea, *et al.*, 2002). Zangaro *et al.* (2007) demonstraram a importância dos FMAs no processo de restauração ambiental e também nos estádios de sucessão. Estes autores verificaram a interação entre FMA e espécies arbóreas pioneiras e secundárias iniciais. Estas plantas na presença de FMA em geral reduziram o comprimento dos pelos radiculares e tiveram maior resposta à micorrização. Assim, os FMAs têm papel importante na determinação da composição da comunidade de plantas (Francis & Read, 1994; Van der Heijden *et al.*, 1998).

Tem sido demonstrado também, a interação dos FMAs com a mesofauna, sendo estes fungos fonte de alimentos para microartrópodes como Collembola (Moore *et al.*, 1985; Tiunov & Scheu, 2005) os quais ainda podem ser agentes de dispersão de FMAs (Klironomos & Moutoglis, 1999). Dessa forma, os FMAs podem ser utilizados como bioindicadores da qualidade do solo. Existem indícios de que os distúrbios dos solos podem alterar as comunidades de FMAs reduzindo o número de esporos e a diversidade mesmo após 12 anos de iniciado o processo de recuperação (Lovera & Cuenca, 1996; Cuenca *et al.*, 1998).

No entanto, a utilização de microssimbiontes como bioindicadores na qualidade de ecossistemas ainda são precários (Hawksworth, 1992) e, assim existe a necessidade de estudar a inter-relação entre os FMAs e os atributos químicos, físicos e outros atributos biológicos.

Além da diversidade microbiana, a diversidade da macrofauna apresenta um importante papel na manutenção da fertilidade do solo, uma vez que as minhocas, por exemplo, participam efetivamente da decomposição, mineralização da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes e da manutenção da estrutura do solo (Lavelle & Spain, 2001). Outros grupos ainda pertencentes à macrofauna edáfica têm sido usados como bioindicadores de distúrbios, bem como da qualidade do solo (Paoletti, 1999; Joschko *et al.*, 2006).

A macrofauna edáfica tem seu benefício cada vez mais conhecido pelo papel ativo que desempenha no crescimento das plantas, na ciclagem de nutrientes (carbono, nitrogênio e fósforo) (Decaëns *et al.*, 1999), na produtividade agrícola (Brown *et al.*,

1999) e na melhoria das propriedades químicas, físicas e biológicas do solo (Assad, 1997; Decaëns et al., 1999; Paoletti, 1999; Lavelle et al., 2006).

Durante o processo de decomposição da matéria orgânica do solo diversos animais pertencentes à macrofauna edáfica podem interagir (Oligochaeta, Diplopoda, Chilopoda, Isoptera, Coleoptera, etc), acelerando ou diminuindo a decomposição, dependendo do tipo e da qualidade do material (Bonkowski et al., 1998). Em termos de fluxo energético da cadeia trófica, os macroinvertebrados no solo desenvolvem principalmente as funções detritívoras e os microrganismos são os principais responsáveis pela mineralização dos nutrientes, cerca de 90%, tornando-os disponíveis na solução do solo (Lavelle, 2000; Lavelle & Spain, 2001).

Dessa forma, são comuns estudos sobre as populações de minhocas (Brown et al., 1999; Brown et al., 2006), além de outros grupos de invertebrados do solo (Paoletti & Hassall, 1999; Ponge et al., 2003; Baretta et al., 2007b) como indicadores de qualidade do solo (Paoletti, 1999; Baretta et al., 2006).

O estudo dos atributos químicos e físicos do solo junto com a macrofauna e os atributos microbianos deve permitir uma comparação mais precisa do uso do solo e a identificação de indicadores discriminantes do estado de conservação dos diferentes sistemas de manejo e sobre a saúde do solo.

2 Objetivos

- Comparar os diferentes atributos físicos, químicos e biológicos em três diferentes estádios de recuperação (4, 8 e 20 anos) com uma área nativa intacta.
- Verificar em diferentes estádios de restauração a presença de FMA e de mesofauna.
- Relacionar os atributos biológicos, físicos e químicos do solo, principalmente os FMAs e a mesofauna, com intuito de encontrar bioindicadores do processo de restauração ambiental.

3 Plano de trabalho e Cronograma

O trabalho será desenvolvido em parceria do Laboratório de Microbiologia do Solo (Profa. Elke J.B.B. Cardoso) localizado no Departamento de Ciência do Solo – ESALA – USP e o Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (Prof.Dra. Siu Mui Tsai), do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, CENA/USP, Piracicaba/SP. As análises estatísticas e da mesofauna serão feitas em conjunto com o Dr Dilmar Baretta da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC/ CEO).

	2° Semestre 2009	1° Semestre 2010	2° Semestre 2010	1° Semestre 2011	2° Semestre 2011	1° Semestre 2012
Disciplinas	X	X	X			
Revisão de Literatura	X					
Delimitação da área de estudo	X					
Primeira Coleta (Chuvosa) - Dezembro	X					
Análise dos atributos físicos, químicos e biológicos (biomassa, respirometria, N e P)		X				
Análise molecular (DGGE/T-RFLP)		X				
Análise da comunidade de FMAs		X	X	X	X	
Segunda Coleta (Seca) - Julho			X			
Análise dos atributos físicos, químicos e biológicos (biomassa, respirometria, N e P)			X			
Análise molecular (DGGE/T-RFLP)			X			
Análises Estatísticas			X			
Relatório Anual FAPESP			X			
Análise da comunidade de FMAs			X	X	X	
Análise da diversidade da Mesofauna e análises estatísticas da primeira e da segunda coleta a ser realizada na UDESC/ CEO				X	X	
Relatório Anual FAPESP				X		X
Revisão de Literatura				X	X	
Submissão de artigos					X	
Intercâmbio (Portugal - Brasil)					X	
Defesa de Tese						X

4 Material e Métodos

4.1 Áreas de estudo e método de coleta

As áreas de estudo pertencem ao Bioma Mata Atlântica sendo reconhecidas como fragmentos da floresta Estacional Semidecídua. As áreas escolhidas possuem diferentes estádios de recuperação ambiental sendo: uma área nativa (Ribeirão Cachoeira - 22°50'13"S - 46°55'58"W), 20 anos (Iracemápolis - 22°35'S - 47°31'W), 8 anos (Santa Barbara D'Oeste - 22°49'06 S - 47°24'52.89"W) e 4 anos (ESALQ/USINA - 22°42'02S- 47°38'32W.).

Apesar de todos os fragmentos pertencerem à floresta Estacional apresentam algumas peculiaridades entre elas em relação ao solo e às causas de degradação. A área nativa de Ribeirão Cachoeira está localizada no município de Campinas-SP perfazendo um total de 233 ha. O clima é Cwa'g - temperado com precipitação anual de aproximadamente 1400 mm e o solo é Podzólico Vermelho Amarelo (Santos e Kinoshita, 2002)

Em Iracemápolis a área restaurada possui 20 hectares, formada por espécies típicas de floresta Estacional Mesófila Semidecídua, e está às margens da represa de abastecimento municipal. O plantio foi feito em 1987, sendo a área cercada por uma estrada de terra com aproximadamente dois metros de largura, formando um aceiro entre o plantio e a plantação de cana-de-açúcar. Esta dominava toda a área anteriormente à recuperação. O clima da região é Cwa com 1.100 a 1.700 mm anuais e o solo predominante é o Latossolo Roxo distrófico (Siqueira, 2002).

A região recuperada de Santa Bárbara D'Oeste encontra-se em torno de uma represa de abastecimento envolvida por uma plantação de cana-de-açúcar. Esta região antes ocupada por cana-de-açúcar foi reflorestada por espécies da floresta Estacional Mesófila Semidecídua. O clima da região é Cwa com uma média de 1460 mm anuais (Unicamp-Cepagri). O solo da região estudada está em fase de estudo e nenhuma informação publicada se encontra disponível.

A área da ESALQ de 16 ha se localiza às margens do rio Piracicaba em uma antiga usina de produção de álcool. Anteriormente era utilizada para a produção de culturas agrícolas anuais. Essa área foi implantada pela SOS Mata Atlântica com 18350 mudas florestais, as quais possuem, atualmente, 3 metros de altura, em média. O clima da região é Cwa com média de 1328 mm anuais (Unicamp-Cepagri). O solo ainda não foi estudado ou não existe ainda informação a respeito.

Todas as quatro áreas selecionadas serão demarcadas em 30 parcelas 10x10 metros, em uma região de 2,5 ha, escolhendo-se ao acaso 15 quadrantes. Serão coletadas 15 amostras por área para análise dos atributos físicos, químicos e biológicos do solo, sendo os pontos de coleta distanciados 20 metros entre si. Estas coletas serão feitas em dois semestres sendo um no período de seca e outro no período de chuva. As análises físicas, químicas e microbiológicas do solo na profundidade de 0 a 20 cm, nos mesmos pontos de coleta.

Observações: Essas análises físicas, químicas e biológicas estão de acordo com aquelas que podem sofrer alterações como verificado em vários trabalhos publicados (Mariani et al., 2006) e não apresentam efeitos de colinearidade o que pode diminuir a eficiência da análise estatística multivariada.

4.2 Avaliação dos atributos físicos e químicos do solo

Será verificada em cada ponto amostral a temperatura do solo com ajuda de um termômetro. As análises físicas serão feitas de acordo com Embrapa (1997) sendo avaliadas umidade, a densidade, a macro e microporosidade e os agregados. Para as análises de densidade e macro e microporosidade serão coletadas amostras indeformadas em anéis volumétricos de 5 cm de diâmetro e 5 cm de altura, na profundidade de 0-5 cm. As análises de umidade e agregados serão feitas por amostras deformadas coletadas na profundidade de 0-20 cm. As análises químicas do solo, coletado na profundidade de 0-20 cm, seguirá as metodologias descritas em van Raij et al. (2001) sendo verificado: o pH (CaCl_2) do solo, o carbono orgânico total, o N disponível (análise de amônia e nitrato) e o P disponível. O N-NH_4^+ e N-NO_3^- do solo serão extraídos com KCl (2 mol L^{-1}) na relação 1:10 (m:v) (5 g de solo + 50 mL de KCl). O N-NH_4^+ será determinado em um sistema de análise de injeção em fluxo contínuo (FIA) (Ismatec Asia) com alcalinização da amostra ($\text{NaOH } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$), microdifusão e leitura em espectrofotômetro a 605 nm na presença do indicador bromocresol púrpura ($0,0074 \text{ mol L}^{-1}$). O N-NO_3^- será determinado por espectrofotometria em ultravioleta (HP Agilent 8453 Spectrophotometer), com adição de HCl (1 mol L^{-1} na relação 1:50 (v:v), para evitar interferências de hidróxidos e carbonatos. A leitura será feita em 220 nm e 275 nm (APHA-AWWA, 2005). O P será determinado por resina trocadora de íons de acordo com van Raij et al. (2001).

4.3 Análises microbiológicas e biológicas do solo

Para determinação do carbono da biomassa microbiana (CBM) das amostras de solo será utilizado o método de fumigação-extração (Vance et al., 1987). A atividade microbiana será determinada através da respiração basal das amostras de solo (C-CO₂) em amostras de 50 g de solo incubadas por 10 dias, a 28°C. O CO₂ liberado será capturado em solução de NaOH 50 mmol L⁻¹ M, precipitado com solução de BaCl₂. 2H₂O 0,5 mol L⁻¹, e quantificado por titulação do NaOH remanescente com HCl 50 mmol L⁻¹ na presença de fenolftaleína (Alef & Nannipieri, 1995). A partir dos resultados de CBM e COT será calculada a relação CBM:COT, expressa como a percentagem de C microbiano em relação ao C total do solo (Anderson, 1994), e o quociente metabólico (qCO_2) que representa a taxa de liberação de C-CO₂ por unidade de C na biomassa microbiana, calculado a partir dos resultados de atividade respiratória basal e do CBM.

A presença ou ausência de FMA será avaliada por extração de esporos seguindo Gerdemann & Nicolson (1963) posteriormente será determinadas os gêneros ou espécies presentes. Além disso, será analisada também a presença e concentração de glomalina produzida pelos FMA. Esta será obtida a partir da autoclavagem a 121 °C por 30 minutos em solução de citrato de sódio (20 mM; pH 7,0) dos agregados de solo (<1 mm) conforme descrito em (Wright & Upadhyaya 1998) e, posteriormente, será dosada a glomalina pelo método de Bradford (1976).

Em cada área, amostras de solo para avaliação da macrofauna serão coletadas nos mesmos pontos de amostragem dos demais atributos do solo. Para tanto, será usado o método de TSBF ou de monólitos (40×40 cm) e triagem manual (Anderson & Ingram, 1993; Baretta et al., 2007a; Velasquez et al. 2007), na profundidade de 0-30 cm.

No método de monólitos, toda a macrofauna será separada manualmente do solo. A coleta de macrofauna também será realizada por meio de armadilhas¹ do tipo “Trampas de Tretzel” (Pitfall traps), constituídas por frascos de vidro com 6 cm de diâmetro, enterrados no solo com a extremidade vazada nivelada com a superfície do solo, permanecendo no local por 3 dias em cada floresta (Bachelier, 1963). Nas

¹Será utilizado este método não TSBF (monólitos de 25x25 cm, com 30 cm de profundidade), principalmente porque são muitas análises a serem feitas e o objetivo principal é capturar artrópodes edáficos.. Baretta et al. (2007b) concluíram que o método das armadilhas é mais eficiente do que somente monólitos para avaliação da diversidade de artrópodes edáficos, especialmente na avaliação de aranhas edáficas em florestas de araucária na região de Campos do Jordão, SP. Esta metodologia foi incluída por exigir menores custos, de fácil medição e fornecer informações importantes no estudo de artrópodes edáficos como indicadores de qualidade ambiental.

armadilhas serão colocados 200 mL de solução detergente, na concentração de 2,5%. Quinze armadilhas serão instaladas, próximas aos pontos de coleta dos atributos edáficos, em cada área. Após a retirada das armadilhas, as amostras serão passadas em peneiras com malhas de 0,20, 0,15 e 0,10 mm, para separar o solo e os fragmentos vegetais, e os animais serão conservados em recipientes com tampa em solução de álcool etílico (Baretta et al. 2008a). A macrofauna será separada em 16 grandes grupos taxonômicos, segundo Velasquez et al. (2007): Oligochaeta, Dictyoptera, Isopoda, Diplopoda, Chilopoda, Dermaptera, Hymenoptera Formicidae, Isoptera, Orthoptera, Coleoptera (adultos e larvas), Hemiptera, Arachnida, Gasteropoda, Lepidoptera (larvas) e Homoptera.

Isto permitirá verificar o efeito da recomposição das áreas e da fauna edáfica associada às espécies florestais, trabalho inédito no Brasil, além de identificar organismos indicadores da qualidade do solo frente à recuperação de áreas degradadas.

4.4 Análise molecular da estrutura da comunidade de microbiana

4.4.1 Extração do DNA total do solo

A extração do DNA total do solo será realizada a partir das amostras de solos previamente homogeneizadas e armazenadas a -80 °C. Para extração do DNA total, será utilizado o protocolo de extração do kit FastDNA[®] Spin for Soil (Q-Biogene). O DNA extraído será posteriormente quantificado utilizando-se como padrão de tamanho e quantidade o marcador de massa Low DNA Mass Ladder (Invitrogen), através de densitometria, após eletroforese em gel de agarose 1% - TBE 0,5X (TBE 1X: 44mM Tris-borato, 1mM EDTA pH 8,0), utilizando-se de um densitômetro a laser FluorImager (GE Healthcare) e o programa Fragment Analysis (GE Healthcare).

4.4.2 PCR

A partir do DNA do solo, fragmentos da região V3 do gene rRNA 16S de microrganismos do domínio *Bacteria* serão amplificados utilizando-se os iniciadores: BA338fGC (5'GCC CGC CGC GCG CGG CGG GCG GGG CGG GGG CAC GGA CTC CTA CGG GAG GCA GCA G 3') e UN518r (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3') (Øvreås et al., 1997). Os *amplicons* resultantes serão quantificados por densitometria após eletroforese em gel de agarose 1% (TBE 0,5X – gel e tampão de corrida), utilizando-se de um densitômetro laser FluorImager (GE Healthcare) e o programa Fragment Analysis (GE Healthcare). O marcador de massa Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) será utilizado como padrão de tamanho e quantidade de DNA.

4.4.3 DGGE

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

4.4.4 T-RFLP

Os produtos de PCR (50 a 60 µl) (ver item 4.4.2) que foi conseguido a partir da extração do DNA (ver item 4.4.1) será tratado com primers marcados com fluorescência sendo feito novo PCR em triplicata e purificados com BioRad's Quantum Prep® PCR Kleen Spin (BioRad). Posteriormente esse produto de PCR (5 µl - 600 ng) será misturado com a enzima de restrição (*MspI* e *HhaI*) e tampão de reação. Essa mistura será preparada com 10 µl de DNA purificado, 1,5 µl de 10 x tampão, 0,75 µl de enzima de restrição (10 U/ µl estoque) e 2,75 µl de água estéril. Será incubada por 3 horas a 37 °C, seguido por 65 °C por 16 minutos para desnaturar a enzima de restrição. Três microlitros do produto de PCR que sofreu tratamento com a enzima de restrição será misturado coquetel de carregamento (1,75 µl de formamida deionizada, 0,25 µl de dextran blue em 50mM EDTA e 0,5 µl de marcador GeneScan 2500 Tamra. Os fragmentos de DNA serão separados por eletroforese (1,800 V por 14 horas) no sequenciador ABI 3100 e a imagem do gel será capturada e o padrão dos fragmentos marcados será analisado utilizando o Genescan (ABI).

5 Análises dos resultados

5.1 Análise da comunidade microbiana

A similaridade entre as estruturas de comunidades de *Bacteria* e *Archaea* será determinada com base na presença ou ausência das bandas detectadas no gel com a utilização do programa Diversity Database (BioRad). A análise do agrupamento hierárquico será feita com o programa Systat 8.0, utilizando-se matrizes de similaridade geradas pelo método de concordância simples (“simple matching”), algoritmo de Ward e a “Distância Euclidiana” como unidade de medida. Serão ainda empregadas técnicas multivariadas para o estudo das comunidades de *Bacteria* das áreas estudadas através do programa estatístico CANOCO versão 4.0 (Ter Braak & Smilauer, 1998). A ordenação baseada na similaridade entre as amostras será obtida pela análise NMDS (Non-metric Multidimensional Scaling – NMDS) através do programa PRIMER 5 (PRIMER-E Ltda, 2001). Subseqüentemente uma análise de similaridade (ANOSIM) será realizada para determinar diferenças estatísticas entre as áreas estudadas utilizando o mesmo programa.

5.2 Fauna de solo e cálculo dos índices de qualidade

Os valores atributos edáficos (Físicos, Químicos e Biológicos) serão utilizados para a obtenção do comprimento do gradiente. Dependendo do comprimento (menor que três = resposta linear), os dados serão submetidos a Análise de Componentes Principais (ACP) ou outra mais indicada pelo programa CANOCO versão 4.0 (Ter Braak, 1986; Ter Braak & Smilauer, 1998; Baretta et al., 2006). Os atributos químicos do solo poderão ser utilizados posteriormente na ACP, como variáveis ambientais explicativas das modificações da diversidade da macrofauna e FMA do solo (Ter Braak & Smilauer, 1998; Baretta et al., 2006) e também dos FMAs. Também serão realizadas análises de correlação canônica (ACC) entre as variáveis estudadas, buscando identificar a porcentagem da variabilidade que é explicada pelas espécies e o quanto se deve as variáveis ambientais. Adicionalmente, as variáveis ambientais e as espécies serão submetidas à análise canônica discriminante (ACD) para identificar quais são os atributos mais relevantes na separação das áreas, e visando o cálculo do seu valor indicador (Baretta, 2007).

Os atributos físicos, químicos e biológicos serão utilizados para construção e validação de um Índice de Qualidade do Solo (IQS). Esse índice foi desenvolvido na França e envolve a respostas das populações da macrofauna frente a variáveis explicativas (químicas e físicas do solo). O IQS será construído a partir de sub-índices.

Também serão identificadas as espécies da macrofauna e FMA mais associadas em cada área, por meio de um valor indicador (Indval). Essa abordagem vem sendo muito discutida na Europa, sendo uma alternativa que pode ser utilizada no Brasil para avaliação de um conjunto de bioindicadores de qualidade do solo, incluindo a macrofauna invertebrada do solo (Ibáñez, 2004). Esse procedimento permite encontrar as espécies indicadoras de um grupo de amostras para as diferentes áreas estudadas, de acordo com o valor indicador de Indval (Dufrêne & Legendre, 1997). O método combina a abundância relativa das espécies com sua frequência relativa de ocorrência. As espécies indicadoras se definem como as espécies mais características de cada grupo, encontradas principalmente em um grupo particular de tipologia (critério de especificidade) e presentes na maioria das áreas destes grupos (critério de fidelidade) (Ibáñez, 2004, Baretta, 2007).

A identificação da macrofauna edáfica e as análises estatísticas multivariada serão realizados no Laboratório de Solos da UDESC/CEO sob co-orientação do Prof. Dr. Dilmar Baretta, efetivo da área de Solos e Sustentabilidade com Especialidade em Fauna do solo da UDESC/CEO.

Referências:

- Alef, K.; Nannipieri, P. (Ed.). 1995. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. London: Academic Press, 576p.
- Alexander, M. 1977. **Introduction to soil microbiology**. New York: John Wiley e Sons, 472 p.
- Allen, E.B. & Allen, M.F. 1988. Facilitation of succession by the nonmycotrophic colonizer *Salsola kali* (Chenopodiaceae) on a harsh site: effects of mycorrhizal fungi. *American Journal of Botany*, **75**, 257-266.
- Allen, E.B. 1989. The restoration of disturbed arid landscapes with special reference to mycorrhizal fungi. *Journal of Arid Environments*, **17**, 279-286.
- Amann, R.I., Ludwig, W. & Schleifer, K.H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *FEMS Microbiology Reviews*, **59**, 143-169.
- Anderson, J.M. & Ingram, J.S.I. 1993. **Tropical soil biology and fertility: a handbook of methods**. 2nd ed. Wallingford: CAB International, 171p.
- Anderson, T.H. 1994. Physiological analysis of microbial communities in soil: Applications and limitations. In: RITZ, K.D. & GILLER, K.E., eds. *Beyond de biomass*. London, British Society of Soil Science, p.67-76.
- Assad, M.L.L. 1997. Fauna do solo. In: Vargas, M.A.T., Hungria, M. (Ed.). **Biologia dos solos dos Cerrados**. Brasília: EMBRAPA, CPAC, p.363-443.
- Bachelier, G. 1963. **La vie animale dans les sols**. Paris: Orstom, 279 p.
- Bago, B.; Pfeffer, P.E.; Abubaker, J.; Jun, J.; Allen, J.W.; Brouillette, J.; Douds, D.D.; Lammers, P.J. & Shachar-Hill, Y. 2003. Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. *Plant Physiology*, **131**, 1-11.
- Barea, J.M., Azcon, R. & Azcon-Aguilar, C. 2002. Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. *Antonie van Leeuwenhoek*, **81**, 343-351.

- Baretta, D.; Baretta, C.R.D.M. & Cardoso, E.J.B.N. 2008a. Análise multivariada de atributos microbiológicos e químicos do solo em florestas com *Araucaria angustifolia*. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, **32**, 2683-2691
- Baretta, D.; Ferreira, C.S.; Sousa, J.P. & Cardoso, E.J.B.N. 2008b Colêmbolos (Hexapoda: Collembola) como bioindicadores de qualidade do solo em áreas com *Araucaria angustifolia*. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, **32**, 2693-2699.
- Baretta, D. 2007. Fauna do solo e outros atributos edáficos como indicadores da qualidade ambiental em áreas com *Araucaria angustifolia* no Estado de São Paulo. **Tese de Doutorado** (Solos e Nutrição de Plantas), Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 158 p.il.
- Baretta, D., Brescovit, A.D. Knysak, I. & Cardoso, E.J.B.N. 2007b. Trap and soil monolith sampled edaphic spiders (Aracnida: Araneae) in *Araucaria angustifolia* forest. *Scientia Agricola*, **64**, 375-383.
- Baretta, D., Brown, G.G., James, S.W. & Cardoso, E.J.B.N. 2007a. Earthworm populations sampled using collection methods in Atlantic Forests with *Araucaria angustifolia*. *Scientia Agricola*, **64**, 384-392.
- Baretta, D., Mafra, Á.L., Santos, J.C.P., Amarante, C.V.T. & Bertol, I. 2006. Análise multivariada da fauna edáfica em diferentes sistemas de preparo e cultivo do solo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **41**, 1675-1679.
- Bonskowski, M., Scheu, S. & Schaefer, M. 1998. Interactions of earthworms (*Octolasion lacteum*), millipedes (*Glomeris marginata*) and plants (*Hordelymus europaeus*) in a beechwood on a basalt hill: implications for litter decomposition and soil formation. *Applied Soil Ecology*, **9**, 161-166.
- Bornemann, J. & Triplett, E.W. 1997. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial populations shifts associated with deforestation. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 2647-2653.
- Blackwood, C.B., Marsh, T., Kim, S.H., Paul, E.A. 2003. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Data Analysis for Quantitative Comparison of Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 926-932.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
- Brookes, P.C., Landman, A., Pruden, G. & Jenkinson, D.S. 1985. Chloroform fumigation and the release of soil-nitrogen—a rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, **17**, 837-842.
- Brown, G.G., James, S.W., Pasini, A., Nunes, D.H., Benito, N.P., Martins, P.T. & Sautter, K.D. 2006. Exotic, peregrine and invasive earthworms in Brazil: diversity, distribution and effects on soils and plants. *Caribbean Journal of Science*, **42**, 331-338.
- Brown, G.G. Pashanasi, B. Villenave, C., Patrón, J.C., Senapati, B.K., Giri, S., Barois, I., Lavelle, P., Blanchart, E., Blackemore, R.J., Spain, A.V. & Boyer, J. 1999. Effects of earthworms on plant production in the tropics. In: Lavelle, P., Brussaard, L. & Hendrix, P.F. (Ed.). **Earthworm management in tropical agroecosystems**.
- Catellan, A.J. 1989. Sistemas de cultura e os microrganismos do solo. **Tese de mestrado** (Ciência do Solo). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, 151p.
- Chodak, M., Pietrzykowski, M. & Niklinska, M. 2008. Development of microbial properties in a chronosequence of sandy mine soils. *Applied Soil Ecology*, doi:10.1016/j.apsoil.2008.11.009
- Cuenca, G., De Andrade, Z. & Escalante, G. 1998. Diversity of Glomelean spores from natural, disturbed and revegetated communities growing on nutrient-poor tropical soils. *Soil Biology and Soil Biochemistry*, **30**, 711-719.
- Decaëns, T., Rangel, A.F., Asakawa, N. & Thomas, R. 1999. Carbon and nitrogen dynamics in situ ageing earthworm casts in grasslands of the eastern Plains of Colombia. *Biology and Fertility of Soils*, **30**, 20-28.

- Degens F.B.P., Schipper, L.A., Sparling, G.P. & Duncan, L.C. 2001. Is the microbial community in soil with reduced catabolic diversity less resistant to stress or disturbance? *Soil Biology and Biochemistry*, **33**, 1143–1153.
- Dexter, A.R. 2004. Soil physical quality: Part I. Theory, effects of soil texture, density, and organic matter, and effects on root growth. *Geoderma*, **120**, 201–214.
- Doran, J.W. & Parkin, T.B. 1994. Defining and assessing soil quality. In: Doran, J.W., Coleman, D.C., Bezdicek, D.F. & Steward, B.A (Ed.). **Defining soil quality for sustainable environment**. Madison: Soil Science Society of America, p.3-21. (SSSA. Special Publication, 35).
- Douds, D.D., Pfeffer, P.E. & Shachar-Hill, Y. 2000. In: Kapulnik, Y., Douds, D.D.J. (eds) *Arbuscular mycorrhizas: physiology and function*. Kluwer, Dordrecht pp 107–129
- Dufrêne, M. & Legendre, P. 1997. Species assemblages and indicator species: the need for a flexible asymmetrical approach. *Ecological Monographs*, **67**, 345-366.
- Ehrlich, P.R. & Wilson, E.O. 1991. Biodiversity studies: science and policy. *Science*, **253**, 758–762.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 1997 Manual de métodos de análise de solo. 2.ed. Rio de Janeiro: Centro Nacional de Pesquisa de Solo, 212 p.
- Francis, R. & Read, D.J., 1994. The contributions of mycorrhizal fungi to the determination of plant community structure. *Plant and Soil*, **159**, 11–25.
- Frighetto, R.T.S. & Valarini, P.J. (Cord.). 2000. **Indicadores biológicos e bioquímicos da qualidade do solo**: manual técnico. Jaguariúna: EMA, 198 p. (Documentos, 21)
- Fritze, H., Pennanen, T. & Vanhala, P. 1997. Impact of fertilizers on the humus layer microbial community of Scots Pine stands growing along a gradient of heavy metal pollution. In: Insam, H., Rangger, A. Eds. , *Microbial Communities. Functional versus Structural Approaches*. Springer, Berlin, pp. 68–83.
- Garland, J.L. & Mills, A.L. 1994. A community-level physiological approach for studying microbial communities. In: Ritz, K., Dighton, J., Giller, K.E. Eds. , *Beyond the Biomass: Compositional and Functional Analysis of Soil Microbial Communities*. Wiley, Chichester, pp.77–84.
- Gerdemann, J.W. & Nicolson, T.H. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*, **46**, 235-244.
- Gerdemann, J.W. & Nicolson, T.H. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*, **46**, 235-244.
- Giovannetti, M. & Mosse, B. 1980. An evaluation of technique for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in roots. *New Phytologist*, **84**, 489-500.
- Graham, J.H. 2000. Assessing costs of arbuscular mycorrhizal symbiosis agroecosystems fungi. In GK Podila, DD Douds Jr, eds, *Current Advances in Mycorrhizae Research*. APS Press, St. Paul, pp 127-140
- Graham, M.H. & Haynes, R.J. 2004. Organic matter status and the size, activity and metabolic diversity of the soil microflora as indicators of the success of rehabilitation of sand dunes. *Biology and Fertility of Soils*, **39**, 429–437
- Hawksworth, D.L. 1992. The fungal dimension of biodiversity: magnitude significance and conservation. *Mycological Research*, **95**, 641– 655.
- Ibáñez, E.V. 2004. **Bioindicadores de calidad de suelo basados en las poblaciones de macrofauna y su relación con características funcionales del suelo**. 2004.186p. Tesis (Doctorado en Ciencias Agropecuarias) - Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Palmira.
- Insam, H. & Domsch, K.H. 1988. Relationship between soil organic carbon and soil microbial biomass on chronosequences of reclamation sites. *Microbial Ecology*, **15**, 177-188.
- Jaggi, W. 1976. Die Bestimmung der CO₂-Bildung als Maß der bonbodenbiologischen Aktivität. *Schwiz Landwirtschaft Forschung Band*, **314**, 317-380.

- Jenkinson, D.S. & Powlson, D.S. 1976. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. V. A method for measuring soil biomass. *Soil Biology and Biochemistry*, **8**, 209–213.
- Joschko, M., Fox, C.A., Lentzsch, P., Kiesel, J., Hierold, W., Krück, S. & Timmer, J. 2006. Spatial analysis of earthworm biodiversity at the regional scale. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **112**, 367-380.
- Klironomos, J.N. & Moutoglis, P. 1999. Colonization of nonmycorrhizal plants by mycorrhizal neighbours as influenced by the collembolan, *Folsomia candida*. *Biology and Fertility of Soils*, **29**, 277-281.
- Kormanik, P.P. & McGraw, A.C. 1982. Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plants roots. Pp. 37-45. In: N.C. Shenck (Ed). **Methods and principles of mycorrhizal research**. Minesota, American Phytopathological Society
- Kozkroj, J. & Van Elsas, J.D. 2000. Application of polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis for comparison of direct and indirect extraction methods of soil DNA used for microbial community fingerprinting. *Biology and Fertility of Soils*, **31**, 372-378.
- Lambais, M.R.; Cury, J.C.; Maluche-Baretta, C.R.D. & Büll, R.C. Diversidade Microbiana nos Solos: Definindo Novos Paradigmas. In: Vidal-Torrado, P.; Alleoni, L.R.F.; Cooper, M.; Silva, A.P. da; Cardoso, E.J. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: SBCS, 2005, v. 4, p. 43-84.
- Lavelle, P. & Spain, A. 2001. **Soil Ecology**. Kluwer Academic Publishers (Ed.), Dordrecht, 654p.
- Lavelle, P., Blanchart, E., Martin, A., Spain, A.V. & Martin, S. 1992. **Impact of soil fauna on the properties of soils in the humid tropics**. Madison: Soil Science Society of America, p.157-185. (SSSA. Special Publication, 29).
- Lavelle, P., Decaëns, T., Aubert, M., Barot, S., Blouin, M., Bureau, F., Margerie, P., Mora, P. & Rossi, J. –P. 2006. Soil invertebrates and ecosystem services. *European Journal of Biology*, **42**, S3-S15.
- Lawton, J.H. & Brown, V.K. 1994. Redundancy in ecosystems. In: Schulze, E.D., Mooney, H.A.. Eds. , *Biodiversity and Ecosystem Function*. Springer, Berlin, pp. 255–270.
- Leckie, S.E. 2005. Methods of microbial community profiling and their application to forest soils. *Forest Ecology and Management*, **220**, 88-106.
- Lovera, M. & Cuenca, G. 1996. Arbuscular mycorrhizal infection in Cyperaceae and Gramineae from natural, disturbed and restored savannas in La Gran Sabana, Venezuela. *Mycorrhiza*, **6**, 111–118.
- Malavolta, E., Vitti, G.C. & Oliveira, S.A. 1989. **Avaliação do estado nutricional das plantas**. Piracicaba: POTAFOS, 201p
- Marinari, S., Mancinelli, R., Campiglia, E., Grego, S. 2006. Chemical and biological indicators of soil quality in organic and conventional farming systems in Central Italy. *Ecological Indicators*, **6**, 701–711.
- Mariani, L., Changa, S.X. & Kabzems, R. 2006. Effects of tree harvesting, forest floor removal, and compaction on soil microbial biomass, microbial respiration, and N availability in a boreal aspen forest in British Columbia. *Soil Biology and Biochemistry*, **38**, 1734–1744
- Mariani, L., Changa, S.X. & Kabzems, R. 2006. Effects of tree harvesting, forest floor removal, and compaction on soil microbial biomass, microbial respiration, and N availability in a boreal aspen forest in British Columbia. *Soil Biology and Biochemistry*, **38**, 1734–1744.
- Marschner, P. & Baumann, K. 2003. Changes in bacterial community structure induced by mycorrhizal colonization in split root maize. *Plant and Soil*, **251**, 279-289.
- Miyauchi, M.Y.H., Lima, D.S., Nogueira, M.A., Lovato, M.L., Murate, L.S., Cruz, M.F., Ferreira, J.M., Zangaro, W., Andrade, G. 2008. Interactions between diazotrophic bacteria and mycorrhizal fungus in maize genotypes. *Scientia agrícola*,. **65**, 525-531.
- Moore, J.C., St. John, T.V. & Coleman, D.C. 1985. Ingestion of vesicular-arbuscular mycorrhizal hyphae and spores by soil microarthropods. *Ecology*, **66**, 1979-1981.
- Moreira, F.M.S. & Siqueira, J.O. 2006. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 729 p.

- Mummey, D.L., Stahl, P.D. & Buyer, J.S. 2002a. Microbial biomarkers as an indicator of ecosystem recovery following surface mine reclamation. *Applied Soil Ecology*, **21**, 251–259.
- Mummey, D.L., Stahl, P.D. & Buyer, J.S., 2002b. Soil microbiological properties 20 years after surface mine reclamation: spatial analysis of reclaimed and undisturbed sites. *Soil Biology and Biochemistry*, **34**, 1717–1725.
- Nakatsu, C.H., Vigdis, T. & LISE, O. 2000. Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. *Soil Science Society of America Journal*, **64**, 1382-1388.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G. & Renella, G. 2003. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, **54**, 655-670.
- Nogueira, M.A, Magalhães, G.C. & Cardoso, E.J.B.N. 2004. Manganese Toxicity in Mycorrhizal and Phosphorus-Fertilized Soybean Plants. *Journal of Plant Nutrition*, **27**, 141–156.
- Osborn, A. M., Moore, R.B. and Timmis, K.N. 2000. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology*, **2**, 39–50.
- Øvreås, L.; Forney, L., Daae, F.L. & Torsvik, V. 1997. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake saelevannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 3367-3373.
- Pankhurst, C.E., Hawkw, B.G., McDonald, H.J., Kirkby, C.A., Buckerfield, J.C., Michelsen, P., O'Brien, K.A., Gupta, V.V.S.R. & DOUBE, B.M. 1995. Evaluation of soil biological properties as potential bioindicators of soil health. *Australian journal of Experimental Agriculture*, **35**, 1015-1028.
- Paoletti, M. G. 1999. Using bioindicators based on biodiversity to assess landscape sustainability. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **74**, 1-18.
- Paoletti, M.G. & Bressan, M. 1996. Soil Invertebrates as Bioindicators of Human Disturbance. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **15**, 21-62.
- Paoletti, M.G. & Hassall, M. 1999. Woodlice (Isopoda: Oniscidea): their potential for assessing sustainability and use as bioindicators. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **74**, 137-155.
- Ponge, J.-F., Patzel, N., Delhay, L., Devigne, E., Levieux, C., Beros, P. & Wittebroodt, R. 1999. Interactions between earthworms, litter and trees in an old-growth beech forest. *Biology and Fertility of Soils*, **29**, 360-370.
- Rao, A.V. & Tak, R. 2001 Influence of mycorrhizal fungi on the growth of different tree species and their nutrient uptake in gypsum mine spoil in India. *Applied Soil Ecology*, **17**, 279–284.
- Rillig, M.C. 2004. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. *Canadian Journal of Soil Science*, **84**, 355–363
- Ryan, M.H. & Graham, J.H. 2002. Is there a role for arbuscular mycorrhizal fungi in production agriculture? *Plant and Soil*, **244**, 263-270.
- Santos, K., Kinoshita, L. S. 2003 Flora arbustivo-arbórea do fragmento de floresta estacional semidecidual do Ribeirão Cachoeira, município de Campinas, SP. *Acta Botanica Brasilica*, **17**, 325-341.
- SAS INSTITUTE. **SAS/STAT**: users guide, release 6.2. SAS Institute Inc., Cary, 1996.
- Schoenholtz, S.H., Van Miegroeth H., Burgerc J.A. 2000. A review of chemical and physical properties as indicators of forest soil quality: challenges and opportunities. *Forest Ecology and Management*, **138**, 335-356
- Siqueira, L.P. Monitoramento de áreas restauradas no interior do Estado de São Paulo, Brasil. Piracicaba, 2002. 116 p. Dissertação (Mestrado)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- Ter Braack, C.J.F. & Smilauer, P. 1998. **CANOCO reference manual and user’s guide to Canoco for Windows**: Software for canonical community ordination (version 4). , New York: Microcomputer Power.

- Tilman, D. & Downing, J.A. 1994. Biodiversity and stability in grasslands. *Nature*, **367**, 363–365.
- Tiunov, A.V. & Scheu, E.S. 2005. Arbuscular mycorrhiza and Collembola interact in affecting community composition of saprotrophic microfungi. *Oecologia*, **142**, 636–642
- Tsai, S.M., Baraibar, A.V.L. & Romani, V.L.M. 1992. Efeito de fatores do solo. In: Cardoso, E.J.B.N.; Tsai, S.M. & Neves, M.C.P. (Ed.). **Microbiologia do solo**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, SP, p. 59-72
- Unicamp-Cepagri. Disponível em: http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima_muni_516.html. Acesso em: 16 mar. 2009
- Van der Heijden, M.G.A., Klironomos, J.N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., Wiemken, A. & Sanders, I.R., 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*, **396**, 69-72.
- van Raij, B., Andrade, J.C., Cantarella, H., Quaggio, J.A. 2001. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. IAC, Campinas Br.
- Vance, E.D., Broocks, P.C. & Jenkinson, D. S. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*, **19**, 703-707.
- Vance, E.D., Brookes, P.C. & Jenkinson, D.S. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass-C. *Soil Biology and Biochemistry*, **19**, 703–707.
- Velasquez, E., Lavelle, P., Andrade, M. 2007. GISQ, a multifunctional indicator of soil quality. *Soil Biology & Biochemistry*, **39**, 3066–3080.
- Widmer, F., Flie Bach, A., Laczko, E., Schulze-Aurich, J. & Zeier, J. 2001. Assessing soil biological characteristics: a comparison of bulk soil community DNA-, PLFA-, and Biolog TM – analyses. *Soil Biology and Biochemistry*, **33**, 1029-1036.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, **51**, 221-271.
- Wright, S.F. & Upadhyaya, A. 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*, **198**: 97-107.
- Yan, F., McBratney, A.B. & Copeland, L. 2000. Functional substrate diversity of cultivated and uncultivated A horizons of vertisols in NW New South Wales. *Geoderma*, **96**, 321–343.
- Zak, J.C., Willig, M.R., Moorhead, D.L. & Wildman, H.G. 1994. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biology and Biochemistry*, **26**, 1101–1108.
- Zangaro, W., Nishidate, F.R., Vandresen, J., Andrade, G. & Nogueira, M.A. 2007. Root mycorrhizal colonization and plant responsiveness are related to root plasticity, soil fertility and successional status of native woody species in southern Brazil. *Journal of Tropical Ecology*, **23**, 53-62.