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

**Bioindicadores de qualidade do solo em um gradiente de
restauração ambiental**

Rafael Leandro de Figueiredo Vasconcellos

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

**Piracicaba
2012**

Rafael Leandro de Figueiredo Vasconcellos
Biólogo

**Bioindicadores de qualidade do solo em um gradiente de restauração
ambiental**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:

Profa. Dra. **ELKE JURANDY BRAN NOGUEIRA CARDOSO**

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

**Piracicaba
2012**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Vasconcellos, Rafael Leandro de Figueiredo

Bioindicadores de qualidade do solo em um gradiente de restauração ambiental /
Rafael Leandro de Figueiredo Vasconcellos. - - versão revisada de acordo com a
resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2012.
113 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Atributos microbiológicos 2. Bioindicadores 3. Fauna edáfica 4. Fungos
micorrízicos 5. Matas ciliares 6. Reabilitação de áreas degradadas 7. Qualidade
do solo I. Título

CDD 631.4
V331b

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

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Vasconcellos, Rafael Leandro de Figueiredo

Bioindicadores de qualidade do solo em um gradiente de restauração ambiental /
Rafael Leandro de Figueiredo Vasconcellos. - - versão revisada de acordo com a
resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2012.
113 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Atributos microbiológicos 2. Bioindicadores 3. Fauna edáfica 4. Fungos
micorrízicos 5. Matas ciliares 6. Reabilitação de áreas degradadas 7. Qualidade
do solo I. Título

CDD 631.4
V331b

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

**À minha amada esposa Livia, aos meus pais Carlos e Vaneza, aos irmãos
Carlos Henrique, Cristiane e Alessandra e aos sobrinhos Maria Antônia,
Beatriz, Pedro Henrique e Letícia,
DEDICO**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter colocado em meu caminho desafios, dificuldades e pessoas excepcionais que me ajudaram nessa jornada de conhecimento e crescimento pessoal. Agradeço aos técnicos e amigos Denise e Fernando pelos ensinamentos e pela ajuda inestimável ao meu trabalho. Agradeço também aos meus colegas de laboratório Mylenne, Cristiane, Marina, Paulo, Daniel, Jamil, Adriano, Rafael Valadares, Rafael Armas, Kelly, Éder, Júlia, Joice, Pilar, German, Emiliana, Júlia Lima, e a todos aqueles colegas que de alguma forma me ajudaram durante essa minha caminhada. Agradeço ao professor Dilmar Baretta pela ajuda com as análises estatísticas e com as complexas interpretações da análise multivariada. Ao professor Fernando Andreote, agradeço pelos conselhos e ensinamentos fundamentais para o desenvolvimento do meu trabalho. À professora Tsai, por ter cedido o laboratório durante o desenvolvimento do meu trabalho e por toda atenção e dedicação, agradeço. Agradeço à professora, amiga e orientadora Elke Cardoso, que ao longo desses cinco anos entre mestrado e doutorado, me acolheu como seu discípulo e me ensinou a aprender. Se não fosse pela professora Elke, nem mesmo esse agradecimento teria sido escrito. Por fim, agradeço à FAPESP por financiar tanto o projeto de pesquisa quanto a bolsa de doutorado, essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigado a todos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	15
1 INTRODUÇÃO	17
Referências	21
2 ESTRUTURA DE BACTERIA E ALTERAÇÃO DOS ATRIBUTOS MICROBIOLÓGICOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES EDÁFICAS E DE COBERTURA FLORESTAL	24
Resumo	24
Abstract	25
2.1 Introdução	25
2.2 Desenvolvimento	27
2.2.1 Material e Métodos	27
2.2.1.1 Histórico e coleta de amostras	27
2.2.1.2 Análise dos Atributos Físicos e Químicos do Solo	29
2.2.1.3 Análise Microbiológica	32
2.2.1.4 Análise T-RFLP	32
2.2.1.5 Análise Estatística	33
2.2.2 Resultados	34
2.2.2.1 Atributos Físicos e Químicos do Solo	34
2.2.2.2 Os atributos microbiológicos e suas interações	35
2.2.2.3 T-RFLP	40
2.2.3 Discussão	41
2.3 Conclusões	47
Referências	47
3 FUNGOS MICORRÍZICOS E PROTEÍNAS DO SOLO RELACIONADAS COM A GLOMALINA EM DIFERENTES CONDIÇÕES EDÁFICAS E DE COBERTURA FLORESTAL	54
Resumo	54
Abstract	54
3.1 Introdução	55
3.2 Desenvolvimento	57
3.2.1 Material e Métodos	57
3.2.1.1 Coleta de Amostras	57
3.2.1.2 Análise dos Atributos Físicos e Químicos do Solo	57
3.2.1.3 Análise Microbiológica	58

3.2.1.4 Extração e identificação de esporos de FMA no solo	58
3.2.1.5 Análise Estatística	59
3.2.2 Resultados	60
3.2.2.1 Relação entre as áreas, as espécies de FMA e os atributos físicos, químicos e microbiológicos	60
3.2.2.2 Influência dos atributos físicos, químicos e microbiológicos sobre a EE-GSRP e T-GRSP	66
3.2.3 Discussão	68
3.3 Conclusões	72
Referências.....	73
4 MACROFAUNA DO SOLO EM DIFERENTES CONDIÇÕES EDÁFICAS E DE COBERTURA FLORESTAL	78
Resumo	78
Abstract	78
4.1 Introdução.....	79
4.2 Desenvolvimento	81
4.2.1 Material e Métodos	81
4.2.1.1 Áreas de Coleta e Amostragem.....	81
4.2.1.2 Análise dos atributos Físicos e Químicos do Solo	82
4.2.1.3 Análise Microbiológica do Solo	82
4.2.1.4 Macrofauna.....	83
4.2.1.5 Análise Estatística	84
4.2.2 Resultados e Discussão	85
4.3 Conclusões	102
Referências.....	102
5 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	109
APÊNDICE	111

RESUMO

Bioindicadores de qualidade do solo em um gradiente de restauração ambiental

Impactos ambientais podem interferir nas características da biomassa microbiana, no processo de ciclagem de nutrientes, nas características físico-químicas e também na diversidade da microbiota e da macrofauna. O objetivo desse trabalho foi conhecer as diferentes interações entre estes atributos e identificar os indicadores da qualidade do solo envolvidos com o tempo de recuperação. Três áreas com estágios diferentes de recuperação (5, 10 e 20 anos) foram comparadas com uma floresta Estacional Semidecídua nativa (NT) com intuito de estudar o comportamento da microbiota, da macrofauna e de suas interações com os atributos físico-químicos. Foram coletadas amostras em 15 pontos por áreas, escolhidos aleatoriamente. Dentre os atributos microbiológicos, a maior atividade das enzimas urease, fosfatase ácida e desidrogeanse foi encontrada na área nativa. O mesmo foi constatado para a respiração basal e para o carbono e nitrogênio da biomassa microbiana. A análise da estrutura da comunidade de Bacteria, feita a partir de T-RFLP, separou as áreas, nativa e de 20 anos de recuperação, das demais, somente no verão. A densidade do solo, a umidade e a microporosidade afetaram negativamente os indicadores microbiológicos do solo, sendo em conjunto com o carbono total do solo os principais fatores discriminantes das áreas. Ocorreu maior presença das espécies de FMA *A. spinosa*, *A. colossica*, *A. lacunosa*, *G. decipiens* e *Gigaspora sp.* na área NT e das espécies *G. viscosum*, *A. mellea*, *A. scrobiculata* e *S. heterogama* na área R05 e *G. rosea* nas áreas R10 e R20. As principais variáveis ambientais que explicam a relação com as espécies de FMA foram microporosidade, macroporosidade, atividade da fosfatase ácida e densidade, umidade, CBM, NBM e N-NO₃. Efeito sazonal sobre as espécies de FMA também foi observado. Maiores valores de proteína do solo relacionada com glomalina (GRSP) foram encontrados no inverno e somente a proteína do solo relacionada com glomalina facilmente extraível (EE-GRSP) separou a área NT das demais. Observou-se, também, alta correlação dessa glicoproteína com os atributos físico-químicos e microbiológicos. Em relação à fauna edáfica ocorreu efeito da sazonalidade e do método de coleta utilizado (armadilhas e monolito). Houve diferença entre os índices de Shanon, Simpson e Pielou somente na época seca, sendo as maiores diferenças nas áreas mais antigas (NT e R20). Maior riqueza foi encontrada ao se utilizar o método de monolito. De acordo com a análise discriminante, Diplopoda foi o principal grupo para as duas épocas e os dois métodos de coleta. Porosidade, densidade basal, umidade, nitrogênio total do solo e atividade das enzimas desidrogenase e urease foram fatores importantes para a separação dos grupos da fauna no gradiente de recuperação ambiental. Esse trabalho mostrou que os atributos biológicos e físico-químicos de qualidade do solo interagem e se modificam de acordo com a idade das áreas e com a sazonalidade.

Palavras-chave: Qualidade do solo; Atributos Microbiológicos; Fungos micorrízicos arbusculares; Fauna edáfica; Mata Ciliar

ABSTRACT

Soil quality bioindicators of an environmental restoration gradient

Environmental impactation can affect microbial biomass, nutrient cycling, processes, physical-chemical characteristics and also the diversity of microbes and edaphic fauna. The aim of this study was to understand the different interactions between these attributes and to identify the indicators of soil quality involved in the recovery process. Three areas with different stages of recovery [5 (R05), 10 (R10) and 20 (R20) years] were compared with a native semideciduous forest (NT) in order to study the behavior of microbes, macrofauna and their interactions with the physical and chemical attributes. Samples were collected at 15 points in each area. Greater activity of urease, acid phosphatase and dehydrogenase were found in the native area. The same result was found for basal respiration, microbial biomass carbon (MBC) and nitrogen (MBN). The structure of Bacteria analyzed by T-RFLP discriminated the native and R20 from R05 and R10, only in the summer. Soil bulk density, humidity and microporosity negatively affected soil microbiological indicators and together with total soil carbon they were the main discriminant factors. *A. colossica*, *A. lacunosa*, *G. decipiens* and *Gigaspora* sp. were more abundant in NT and the species *G. viscosum*, *A. mellea*, *A. scrobiculata* and *S. heterogama* in R05 and *G. rosea* in R10 and R20. Porosity, soil bulk density, humidity, acid phosphatase activity, MBC, MBN and N-NO_3^- were the principal environmental variables related to AMF species distribution. Seasonal influences on AMF species were also observed. Higher glomalin related soil protein (GRSP) content was found only in the winter and NT had only EE-GRSP (easily extracted glomalin related soil protein) different from the recovery areas. Correlations among glomalin and physical-chemical and microbiological attributes were observed. Edaphic fauna groups were influenced by seasonality and by sampling methodology (pitfall traps and monoliths). Shannon's, Simpson's and the evenness index were significant only in the dry season and in the oldest areas. Richness was higher when the monolith method was used. Diplopoda was the principal group that discriminated the recovery gradient for both seasons and methodologies. Porosity, soil bulk density, humidity, total nitrogen, urease and dehydrogenase were important factors to separate faunal groups. This work showed that biological and physico-chemical soil quality attributes interact and changed according to gradient recovery and seasonality.

Keywords: Soil quality; Microbiological attributes; Arbuscular mycorrhizal fungi; Edaphic fauna; Riparian forest

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1 - Precipitação, temperatura média e indicação das épocas de coleta da região em que se localizam as quatro áreas de estudo29
- Figura 2.2 - Análise de Redundância entre atributos microbiológicos e físico-químicos no verão (A) e no inverno (B). Flechas cinzentas pontilhadas representam as variáveis microbiológicas com as seguintes denominações ou abreviações: qCO_2 , Respiração Basal (Resp), Desidrogenase, Fosfatase Ácida (FosfaAc), Urease, Celulase, Carbono da Biomassa Microbiana (CBM) e Nitrogênio da Biomassa microbiana. Flechas negras representam as variáveis físicas e químicas com as seguintes denominações ou abreviações: $N-NH_4$, $N-NO_3$, Carbono total do Solo (SoCarb), nitrogênio total do solo (SoNitr), umidade, microporosidade, densidade, Fósforo do Solo (SoP), pH (KCl) e pH (H_2O). As flechas cinzentas representam os centróides das áreas adicionadas como variáveis suplementares no modelo39
- Figura 2.3 - Análise do escalonamento multidimensional não paramétrico (NMDS) das UTOs (Unidades taxonômicas Operacionais) referentes à diversidade de Bactéria das quatro áreas (NT, R20, R10 e R05), utilizando as enzimas HhaI (A, Verão e B, Inverno) e MspI (C, Verão e D, Inverno)41
- Figura 3.1 – Representação gráfica da análise de componentes principais das espécies de FMA em relação às quatro áreas (nativa, R20, R10 e R05) avaliadas no verão (A) e no inverno (B). (A) CP1 (32,9 %) e CP2 (26,3 %); (B) CP1 (39,2%) e CP2(18,1). (n=5). *Glomus* (soma das espécies não identificadas *Glomus* sp1, *G. sp2*, *G. sp3*, *G. sp4* e *G. sp5*. *Gigaspora* (soma das espécies *Gigaspora* sp1 e *Gi. sp2*)62
- Figura 3.2 - Representação gráfica da análise de redundância (RDA) utilizando o método de análise de coordenadas principais (PCoA) para a distribuição das espécies de FMA. Densidade (dens), microporosidade (microp), macroporosidade (macrop), umidade (umid), carbono da biomassa microbiana (CBM), nitrogênio da biomassa microbiana (NBM), carbono total do solo (Carb T), nitrogênio total do solo (NiT), N na forma de nitrato ($N-NO_3$), atividade da urease (Urease) e atividade da fosfatase ácida (FAC) foram usadas como variáveis explicativas nas duas épocas de coleta verão (A) e inverno (B). (A) Eixo 1 (39,7) e Eixo 2 (20,9 %). (B) Eixo 1 (33,3 %) e Eixo 2 (30,7 %). (n=15). *Glomus* (soma das espécies não identificadas *Glomus* sp1, *G. sp2*, *G. sp3*, *G. sp4* e *G. sp5*. *Gigaspora* (soma das espécies *Gigaspora* sp1 e *Gi. sp2*)65
- Figura 3.3 - Média dos valores EE-GRSP (A) e T-GRSP (B) entre as quatro áreas (NT, R20, R10 e R05), nas duas épocas de coleta e desvio padrão da média, n=15. Barras seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). * representa a diferença entre época ($p \leq 0,05$) na mesma área67

- Figura 4.1 - Valores de riqueza e índices (Shannon, Simpson e Pielou) da macrofauna edáfica avaliada pelo método TSBF para as florestas nativa - controle (NT), com 20 anos (R20), com 10 anos (R10) e com 5 anos (R05), na época chuvosa (A) e seca (B). Áreas contendo letras iguais não diferem entre si pelo teste de LSD ($p \leq 0,05$) 88
- Figura 4.2 - Valores de riqueza e índices (Shannon, Simpson e Pielou) da fauna edáfica coletada pelo método das armadilhas (Pitfall traps) para as quatro áreas (NT, R20, R10 e R05) na época chuvosa (A) e seca (B). Áreas contendo letras iguais não diferem entre si pelo teste de LSD ($p \leq 0,05$) 89
- Figura 4.3 - Relação entre as funções discriminantes canônicas 1 e 2 (FDC1 e FDC2) referentes aos coeficientes canônicos homogêneos (HCC) para a macrofauna edáfica avaliada pelo método TSBF nas épocas Chuvosa (A) e Seca (B). Áreas seguidas pela mesma letra, em cada função discriminante canônica, não diferiram entre si pelo teste LSD ($p \leq 0,05$) 94
- Figura 4.4 - Relação entre as funções discriminantes canônicas 1 e 2 (FDC1 e FDC2) referentes aos coeficientes canônicos homogêneos (HCC) da fauna avaliada pelo método das armadilhas (*Pitfall traps*) nas épocas chuvosa (A) e seca (B). Áreas seguidas pela mesma letra, em cada função discriminante canônica, não diferiram entre si pelo teste LSD ($p \leq 0,05$) 96
- Figura 4.5 - Análise de Redundância entre as quatro áreas (nativa, R20, R10 e R05) nas épocas chuvosa (A) e seca (B) referente à macrofauna edáfica avaliada pelo método TSBF e sua relação com atributos físicos, químicos e biológicos do solo. Outros: somatório de Lepidoptera, Larvas de Lepidoptera, Griloblattodea e Thysanoptera. Setas NT, R20, R10 e R05 representam o centróide. 98
- Figura 4.6 - Análise de Redundância entre as quatro áreas (nativa, R20, R10 e R05) nas épocas chuvosa (A) e seca (B), referente à fauna edáfica, avaliada pelo método de armadilhas (*Pitfall traps*), e sua relação com atributos físicos, químicos e biológicos do solo. Outros: Somatório de Griloblattodea, Lepidoptera, Larvas de Lepidoptera e Orthoptera. Setas NT, R20, R10 e R05 representam o centróide. 101

LISTA DE TABELAS

- Tabela 2.1 - Atributos físico-químicos dos solos da floresta nativa (NT) e das áreas em recuperação R20, R10 e R05. Valores médios ($n=3$ para silte, argila e areia e $n=15$ para as demais) e desvio padrão são apresentados. Para densidade, macroporosidade e microporosidade valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si (Tukey $p \leq 0,05$)31
- Tabela 2.2 - Carbono e nitrogênio total, umidade, $N-NO_3$ e $N-NH_4$ das quatro áreas nas duas épocas de estudo (verão e inverno). Valores médios ($n=15$) e desvio padrão são apresentados. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si (Tukey $p \leq 0,05$).....31
- Tabela 2.3 - Atributos Microbiológicos referentes às duas épocas de coleta. Variáveis seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Tukey $p \leq 0.05$), dentro da mesma época de coleta37
- Tabela 2.4 - Coeficiente de correlação entre os atributos microbiológicos nas duas épocas de coleta (verão/inverno)38
- Tabela 2.5 - Coeficiente de correlação entre os principais atributos físico-químicos e microbiológicos nas duas épocas de coleta (verão/inverno)38
- Tabela 2.6 - Valores de R do teste de comparação entre os UTOs referentes à análise de T-RFLP e às enzimas (HhaI e MspI), para as duas épocas de amostragem40
- Tabela 3.1 – Números de esporos de FMA identificados (50 g de solo seco) na área Nativa (NT), e em gradiente de recuperação ambiental (R20, R10 e R05) ($n=15$). Tabela cedida por Bonfim (2011)61
- Tabela 3.2 - Coeficiente de correlação entre glomalina (EE-GRSP e T-GRSP) e os atributos microbiológicos nas duas épocas de coleta (verão/inverno) ($n=15$).....68
- Tabela 4.1 - Valores dos coeficientes canônicos homogêneos (HCC), correlação canônica (r) e Taxa de Discriminação Paralela (TDP: $r \times HCC$) referentes à análise canônica discriminante (ACD) quanto aos grupos da macrofauna edáfica avaliada pelo método TSBF, nas duas épocas de coleta, independente da área avaliada. Valores em negrito representam os atributos mais importantes para discriminar as áreas de estudo ($n=60$; 15x4 áreas).....92
- Tabela 4.2 - Valores dos coeficientes canônicos homogêneos (HCC), correlação canônica (r) e Taxa de Discriminação Paralela (TDP: $r \times HCC$) referentes à análise canônica discriminante (ACD) quanto aos grupos da macrofauna edáfica avaliada pelo método armadilhas, nas duas épocas de coleta, independente da área avaliada. Valores em negrito representam os atributos mais importantes para discriminar as áreas de estudo ($n=60$; 15x4 áreas).....93

1 INTRODUÇÃO

A qualidade do solo pode ser definida como a capacidade de funcionamento, dentro do ecossistema e das limitações de uso, a qual permite a sustentabilidade biológica e favorece a manutenção e sobrevivência de plantas, de animais e do homem (KARLEN et al., 1997; KNOEPP et al., 2000). Essa qualidade é verificada pela interação dos três atributos: físico, químico e biológico. Dentre os atributos físicos destacam-se como importantes indicadores de qualidade a textura, a densidade, a porosidade e os agregados do solo (SCHOENHOLTZ; MIEGROET; BURGER, 2000). A textura é uma das principais propriedades do solo e influencia a ciclagem de água, nutrientes e a oxigenação, dependendo mais das características do solo que propriamente do manejo (SCHOENHOLTZ; MIEGROET; BURGER, 2000). A compactação e a porosidade são também fatores importantes, pois estão relacionados à capilaridade e interferem no equilíbrio entre ar/água, no desenvolvimento radicular, na atividade da fauna e da microbiota (VELASQUEZ; LAVELLE; ANDRADE, 2007; PENGTHAMKEERATI; MOTAVALLI; KREMER, 2011).

A matéria orgânica pode ajudar na redução da densidade basal do solo, na retenção de umidade, na formação de agregados mais estáveis e na proteção da microbiota (PENGTHAMKEERATI; MOTAVALLI; KREMER, 2011). Possui grande importância funcional devido ao papel na ciclagem de nutrientes e na manutenção das condições físicas e biológicas do solo. Em conjunto com o pH, está entre os principais atributos químicos da qualidade do solo. O pH está diretamente relacionado com a disponibilidade de nutrientes e solubilidade de minerais e pesticidas (KARLEN et al., 1997). Teores de nutrientes disponíveis como nitrogênio e fósforo são também importantes para a qualidade do solo, principalmente quando relacionado com a produtividade (SCHOENHOLTZ; MIEGROET; BURGER, 2000). O nitrogênio mineral é utilizado como indicador da qualidade do solo por conta de sua sensível relação com a matéria orgânica, biomassa microbiana, temperatura e umidade do solo (KNOEPP et al., 2000). O fósforo é um dos fatores limitantes para o desenvolvimento vegetal devido à sua baixa concentração em solução e, ainda fica adsorvido aos óxidos de ferro e alumínio, principalmente em solos altamente intemperizados.

Os microrganismos possuem papel fundamental na manutenção das condições saudáveis do solo, sendo responsáveis pelos processos biológicos e

bioquímicos como: fixação do N₂, nitrificação, amonificação, mineralização da matéria orgânica, solubilização de fosfatos e simbiose com animais e plantas. Desse modo, são de fundamental importância na recuperação dos solos degradados e na manutenção da qualidade e produtividade dos ecossistemas (SCHOENHOLTZ; MIEGROET; BURGER, 2000; MENDES FILHO et al., 2010). Devido à sensibilidade da microbiota do solo às modificações, diversos parâmetros microbiológicos e bioquímicos são apontados como bioindicadores da qualidade do solo (MARINARI et al., 2007).

O perfil da comunidade da microbiota e a sua funcionalidade podem ser determinados pela diversidade de nichos e de fontes de nutrientes às quais está associada e, portanto, à ocorrência de processos essenciais para a manutenção da qualidade do solo. A técnica do DGGE (denaturing gradient gel eletrophoresis) e do T-RFLP (Terminal Fragment Length Polymorphism), empregada após obtenção de ácidos nucleicos do ambiente, permitem a identificação da estrutura da comunidade microbiana do solo (BASTIDA et al., 2008) e das relações com impacto ambiental e manejo (CHU et al., 2007; CHODAK; NIKLIŃSKA 2010; PENGTHAMKEERATI; MOTAVALLI; KREMER, 2011).

A participação da microbiota do solo como bioindicadores de alterações no solo também pode ser avaliada a partir da biomassa microbiana, do quociente metabólico e da respiração basal, principais parâmetros adotados (CHODAK; PIETRZYKOWSKI; NIKLIŃSKA, 2009). Alguns trabalhos sugerem que a diversidade funcional microbiana está diretamente relacionada com o aumento do conteúdo de carbono orgânico e da biomassa microbiana, os quais podem melhorar a funcionalidade e a estabilidade do ecossistema edáfico (YAN; McBRATNEY; COPELAND, 2000; DEGENS et al., 2001). Entretanto, alguns processos de restauração do solo podem demorar mais de vinte anos para atingir as características de um solo não perturbado como, por exemplo, de biomassa e diversidade microbiana (GRAHAM; HAYNES, 2004; CHODAK; PIETRZYKOWSKI; NIKLIŃSKA, 2009).

Além dos diferentes grupos funcionais microbianos do solo destacam-se também os FMA (fungos micorrízicos arbusculares), os quais possuem papel fundamental na manutenção das condições ambientais do solo. Os FMA 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, entre 4 a 20 % superior à das plantas não micorrizadas, e estimular um incremento de carbono do solo estimado em 5 bilhões de toneladas por ano (BAGO; PFEFFER; SCHACHARHIL, 2000). A extensa rede de hifas formada pelos fungos micorrízicos 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 (CARDOSO; KUYPER, 2006).

Essas hifas externas se emaranham às partículas de areia, silte e argila, formando macroagregados mais estáveis, aumentando a resistência do solo à erosão (CARDOSO; KUYPER, 2006). Além disso, a produção de glomalina pelos FMA também interfere nas características físicas do solo, alterando, principalmente, a agregação do solo (RILLIG, 2004). Além disso, os FMA formam interação com bactérias fixadoras de nitrogênio, como as diazotróficas, o que pode ajudar na ciclagem de nutrientes e na melhoria das condições nutricionais do solo (MIYAUCHI et al., 2008). Os FMA têm sido, inclusive, utilizados como ferramentas na recuperação de áreas degradadas (MENDES FILHO et al., 2010). Contudo, a perturbação do solo pode alterar as comunidades de FMA, reduzindo o número de esporos e da diversidade, mesmo após 12 anos de iniciado o processo de recuperação (LOVERA; CUENCA, 1996; CUENCA; DE ANDRADE; ESCALANTE, 1998).

Além da microbiota, a macrofauna apresenta um importante papel na manutenção da fertilidade do solo. Vários grupos, pertencentes à macrofauna edáfica, como minhocas, cupins e formigas têm sido usados como indicadores biológicos de distúrbios, bem como no estudo da qualidade do solo (LAVELLE et al., 2006). A macrofauna tem seu benefício cada vez mais conhecido pelo papel ativo que desempenha no crescimento das plantas, na ciclagem de nutrientes (carbono, nitrogênio e fósforo), na produtividade agrícola e na melhoria das propriedades químicas, físicas e biológicas do solo (JOSCHKO et al., 2006; LAVELLE et al., 2006). 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 (LAVELLE et al., 2006).

A floresta Atlântica e as regiões tropicais têm sido impactadas de modo a ocorrer perdas de diversidade e das funções ecológicas (RIBEIRO et al., 2009). No Brasil, apenas 1 % da floresta Atlântica está intacta e mais de 80 % dos fragmentos

possuem menos de 50 ha em tamanho (RIBEIRO et al., 2009). Destacam-se, nesse contexto, as florestas ripárias, que são fundamentais para garantir melhor qualidade da água e proteger os rios contra assoreamento e erosão do solo, e ainda são importantes corredores ecológicos para a fauna (LEES; PERES, 2008). Contudo, estudos que abrangem a interação entre atributos físicos, químicos e biológicos são escassos, especialmente no contexto de recuperação florestal (CHABRERIE et al., 2003).

O processo de recuperação depende de vários fatores para que se chegue a um estágio mais próximo das condições naturais. Após a definição e demarcação da área e das espécies nativas a serem plantadas, é importante uma adequação do solo e do controle de pragas (p. ex. formigas cortadeiras), para que as plantas sejam capazes de se desenvolver. Geralmente, as áreas a serem recuperadas sofreram algum tipo de atividade agrícola ou servem como pastagem que podem gerar compactação devido ao manejo agrícola e da ação dos maquinários agrícolas e do pisoteio do gado (BERTOL et al 2000a; BERTOL et al 2000b). A compactação causa a redução da porosidade, impede o desenvolvimento radicular, reduz a aeração, estimula a desnitrificação e reduz a atividade microbiana (SILVA et al., 2011). As formigas cortadeiras prevalecem em ambientes com maior recurso alimentar e menos competidores e predadores como em pastagens e matas abertas (ANJOS; MOREIRA; DELLA LUCIA, 1993). Durante o processo de recuperação essas formigas podem reduzir drasticamente o número de mudas e impedir a recuperação ambiental.

A verificação das funções ecológicas e do avanço da recuperação é importante para que ações mitigadoras sejam tomadas. A avaliação dos atributos físicos, químicos e biológicos envolvidos nesse processo pode ser uma forma de verificar o avanço dessa recuperação e de indicar mecanismos de ação para acelerar o processo de recuperação. Desse modo, o objetivo desse trabalho foi verificar a influência dos atributos físicos (p.ex. densidade e porosidade) e químicos (p. ex. teor de carbono e nitrogênio do solo) em três áreas em diferentes estágios de recuperação (20, 10 e 05 anos) em comparação com uma área nativa controle utilizando principalmente os atributos biológicos do solo (microrganismos, FMA e macrofauna edáfica).

Referências

- ANJOS, N.; MOREIRA, D.D.O.; DELLA LUCIA, T.M.C. 1993. Manejo Integrado de Formigas Cortadeiras em Reflorestamentos. In: DELLA LUCIA T.M.C. **As formigas cortadeiras**. Viçosa, Folha de Viçosa, 1993. p. 212-241.
- BAGO, B.; PFEFFER, P.E.; SHACHAR-HILL, Y. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. **Plant Physiology**, Rockville, v. 124, n. 3, p. 949-957, 2000
- BAGO, B.; PFEFFER, P.E.; ABUBAKER, J.; JUN, J.; ALLEN, J.W.; BROUILLETTE, J.; DOUDS, D.D.; LAMMERS, P.J.; SHACHAR-HILL, Y. Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. **Plant Physiology**, Rockville, v. 131, n. 3, p. 1-11, 2003.
- BASTIDA, F.; ZSOLNAY, A.; HERNÁNDEZ, T.; GARCÍA, C. Past, present and future of soil quality indices: A biological perspective. **Geoderma**, Amsterdam, v. 147, n. 3/4, p. 159-171, 2008.
- BERTOL, I.; ALMEIDA, J.A.; ALMEIDA, E.X.; KURTZ, C. Soil physic properties related to forage offer levels of dwarf elephant grass CV. Mott. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 5, p. 1047-1054, 2000a.
- BERTOL, I.; SCHICK, J.; MASSARIOL, J.M.; REIS, E.F.; DILY, L. Physical properties of an haplumbrepts as affected by soil management. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 91-95, 2000b.
- CARDOSO, I.M.; KUYPER, T.W. Mycorrhizas and tropical soil fertility. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 116, n. 1/2, p. 72-84, 2006.
- CHABRERIE, O.; LAVAL, K.; PUGET, P.; DESAIRE, S.; ALARD, D. Relationship between plant and soil microbial communities along a successional gradient in a chalk grassland in north-western France. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 24, p. 43-56, 2003.
- CHODAK, M.; NIKLIŃSKA, M. Effect of texture and tree species on microbial properties of mine soils. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 46, n. 2, p. 268-275, 2010.
- CHODAK, M.; PIETRZYKOWSKI, M.; NIKLIŃSKA, M. Development of microbial properties in a chronosequence of sandy mine soils. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 41, n. 3, p. 259-268, 2009.
- CHU, H.Y.; LIN, X.G.; FUJII, T.; MORIMOTO, S.; YAGI, K.; HU, J.L.; ZHANG, J.B. Soil microbial biomass, dehydrogenase activity, bacterial community structure in response to long-term fertilizer management. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 39, n.11, p. 2971-2976, 2007.
- CUENCA, G.; DE ANDRADE, Z.; ESCALANTE, G. Diversity of Glomelean spores from natural, disturbed and revegetated communities growing on nutrient-poor tropical soils. **Soil Biology and Soil Biochemistry**, Kidlington, v. 30, n. 6, p. 711-719, 1998.

DEGENS, 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**, Kidlington, v. 33, n. 9, p. 1143–1153, 2001.

GRAHAM, M.H.; HAYNES, R.J. Organic matter status and the size, activity and metabolic diversity of the soil microflora as indicators of the success of rehabilitation of mined sand dunes. **Biology and Fertility of Soils**, Scottsville, v. 39, n. 6, p. 429-437, 2004.

JOSCHKO, M.; FOX, C.A.; LENTZSCH, P.; KIESEL, J.; HIEROLD, W.; KRÜCK, S.; TIMMER, J. Spatial analysis of earthworm biodiversity at the regional scale. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 112, n. 4, p. 367-380, 2006.

KARLEN, D.L.; MAUSBACH, M.J.; DORAN, J.W.; CLINE, R.G.; HARRIS, R.F.; SCHUMAN, G.E. Soil Quality: A Concept, Definition, and Framework for Evaluation. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 61, n. 1, p. 4-10, 1997.

KNOEPP, J.D.; COLEMAN, D.C.; CROSSLEY, D.A.; CLARK, J.S. Biological indices of soil quality: an ecosystem case study of their use. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 138, n. 1/3, p. 357-368, 2000.

LAVELLE, P.; DECAËNS, T.; AUBERT, M.; BAROT, S.; BLOUIN, M.; BUREAU, F.; MARGERIE, P.; MORA, P.; ROSSI, J.P. Soil invertebrates and ecosystem services. **European Journal of Biology**, Paris, v. 42, p. S3-S15, 2006.

LEES, A.C.; PERES, C.A. Conservation value of remnant riparian forest corridors of varying quality for Amazonian birds and mammals. **Conservation Biology**, Malden . v. 22, p. 439-449, 2008.

LOVERA, M.; CUENCA, G. Arbuscular mycorrhizal infection in Cyperaceae and Gramineae from natural, disturbed and restored savannas in La Gran Sabana, Venezuela. **Mycorrhiza**, New York, v. 6, n. 2, p. 111-118, 1996.

MARINARI, S.; MANCINELLI, R.; CAMPIGLIA, E.; GREGO, S. Chemical and biological indicators of soil quality in organic and conventional farming systems in Central Italy. **Ecological Indicators**, Amsterdam, v. 6, n. 4, p. 701-711, 2006.

MENDES FILHO, P.F.; VASCONCELLOS, R.L.F.; PAULA, A.M.; CARDOSO, E.J.B.N. Evaluating the potential of forest species under microbial management for the restoration of degraded mining areas. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 208, n. 1/4, p. 79-89, 2010.

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. Interactions between diazotrophic bacteria and mycorrhizal fungus in maize genotypes. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, n. 5, p. 525-531, 2008.

PENGTHAMKEERATI, P.; MOTAVALLI, P.P.; KREMER, R.J. Soil microbial activity and functional diversity changed by compaction, poultry litter and cropping in a claypan soil. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 48, n. 1, p. 71-80, 2011.

RIBEIRO, M.C.; METZGER, J.P.; MARTENSEN, A.C.; PONZINI, F.J.; HIROTA, M.M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, Oxford, v. 142, n. 6, p.1141-1153, 2009.

RILLIG, M.C. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v. 84, n. 4, p. 355-363, 2004.

SCHOENHOLTZ, S.H.; MIEGROET, H.V.; BURGER, J.A. A review of chemical and physical properties as indicators of forest soil quality: challenges and opportunities. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 138, n. 1/3, p. 335-356, 2000.

SILVA, S.R.; SILVA, I.R.; BARROS, N.F.; MENDONÇA, E.S. Effect of compaction on microbial activity and carbon and nitrogen transformations in two oxisols with different mineralogy. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, n. 4, p.

VELASQUEZ, E.; LAVELLE, P.; ANDRADE, M. GISQ, a multifunctional indicator of soil quality. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 39, n. 12, p. 3066-3080, 2007.

YAN, F.; McBRATNEY, A.B.; COPELAND, L. Functional substrate diversity of cultivated and uncultivated A horizons of vertisols in NW New South Wales. **Geoderma**, Amsterdam, v. 96, n. 4, p. 321–343, 2000.

2 ESTRUTURA DE BACTERIA E ALTERAÇÃO DOS ATRIBUTOS MICROBIOLÓGICOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES EDÁFICAS E DE COBERTURA FLORESTAL

Resumo

O estudo dos indicadores microbiológicos, físicos e químicos do solo é fundamental para o entendimento do processo de recuperação ambiental. O objetivo desse trabalho foi avaliar alguns indicadores físicos, químicos e microbiológicos do solo em diferentes estádios de recuperação (20 anos - R20, 10 anos - R10 e 5 anos - R05) de mata ciliar em comparação a uma área nativa (NT), no verão e no inverno. Foram analisados os atributos físicos e químicos: densidade, umidade, porosidade, conteúdo total de carbono (C) e nitrogênio do solo (N), N-NH_4^+ e N-NO_3^- . Os atributos microbiológicos analisados foram: CBM e NBM (Carbono e Nitrogênio da Biomassa Microbiana), respiração basal, coeficiente metabólico ($q\text{CO}_2$), estrutura de comunidade de Bacteria (T-RFLP) e a atividade enzimática (Desidrogenase, Urease, Fosfatase Ácida e Celulase). As áreas e os atributos físicos, químicos e microbiológicos foram comparados a partir do teste de Tukey, análise de correlação de Pearson e análise de redundância canônica (RDA). Os dados de T-RFLP foram analisados por NMDS (Nonmetric Multidimensional Scaling) e ANOSIM (análise de similaridade). Menores valores de densidade foram encontrados na área NT ($1,33 \text{ g cm}^{-3}$) e R20 ($1,37 \text{ g cm}^{-3}$). A macroporosidade na NT ($0,21 \text{ m}^3 \text{ m}^{-3}$) foi cerca de duas vezes superior à área R20 e R10, e quatro vezes a R05. O C e o N totais do solo foram duas vezes maiores na área NT tanto no verão quanto no inverno. O N-NH_4^+ e N-NO_3^- variaram em relação à estação do ano e à idade das áreas, sendo maiores na área NT e cerca de 3 vezes superiores no verão. Os valores de biomassa microbiana de carbono e de atividade da urease foram consistentes com o gradiente de recuperação. A atividade da desidrogenase, no inverno, seguiu as características de textura do solo. Os atributos físicos do solo, principalmente densidade e microporosidade, tiveram efeito negativo sobre os atributos microbiológicos do solo. A RDA indicou maior influência da densidade, da umidade e do carbono total do solo para discriminar as áreas. Houve correlação entre os atributos microbiológicos principalmente entre a CBM e NBM e a atividade da urease e da desidrogenase. O T-RFLP mostrou maior semelhança quanto à estrutura de comunidade de Bacteria entre as áreas NT e R20 somente no verão. Foi possível observar com esse trabalho que o clima e a idade das áreas podem influenciar na avaliação dos indicadores e na estrutura de comunidade microbiana.

Palavras-chave: Áreas degradadas; Atividade enzimática; Biomassa microbiana; Qualidade do solo; T-RFLP

Abstract

Knowledge about the microbiological, physical, and chemical properties of soils is essential for understanding ecological restoration. The aim of this study was to evaluate physical, chemical, and microbiological soil indicators along a recovery gradient in riparian forests—undisturbed forest (NT) and 20 year-old (R20), 10 year-old (R10), and 5 year-old (R05) forests—in two seasons (austral summer and winter). We analyzed the following physical and chemical attributes: soil bulk density, moisture, porosity, total carbon (TC), total nitrogen (TN), and N-NH₄⁺ and N-NO₃⁻ content. The microbiological attributes analyzed were microbial biomass carbon (MBC), microbial biomass nitrogen (MBN), CO₂ evolution (C-CO₂), metabolic coefficient (qCO₂), Bacteria community structure (T-RFLP), and enzyme activity (dehydrogenase, urease, acid phosphatase and cellulase). Soil attributes of the four sites were compared with Tukey tests, Pearson correlations, and canonical redundancy analysis (RDA). T-RFLP profile data were analyzed by NMDS (Non-metric Multidimensional Scaling) and ANOSIM (analysis of similarity). Lower soil bulk density values were found at the NT (1.33 g cm⁻³) and R20 (1.37 g cm⁻³) sites. Macroporosity at the NT site (0.21 m³ m⁻³) was about two times higher than at the R20 and R10 sites, and four times higher than at the R05 site. TC and TN were twice as high at the NT site in both seasons. N-NH₄⁺ and N-NO₃⁻ content varied according to season and recovery age, being greatest at the NT site and about 3 times higher in summer. Microbial biomass carbon (MBC) and urease were consistent with the gradient independently of differences in soil physical attributes. Dehydrogenase activity, in winter, followed the texture differences among the sites. Physical attributes like soil bulk density and microporosity had a negative effect on microbiological attributes. RDA indicated that soil bulk density, moisture, and TC were the variables that best tracked the recovery gradient. There was a higher correlation between microbiological attributes, especially between MBC, MBN, and urease and dehydrogenase activity. T-RFLP showed greater Bacteria community similarity between the NT and R20 sites, only in the summer. We conclude that seasonality and age of recovery affect microbial community structure and the interpretation of biological indicators of soil quality.

Keywords: Degraded area; Enzymatic activity; Microbial biomass; Soil quality; T-RFLP

2.1 Introdução

A transformação de florestas em áreas agrícolas tem causado degradação dos solos e a perda de diversidade biológica. Dentro deste contexto, indicadores microbiológicos, físicos e químicos de qualidade para acessar e entender os processos de recuperação e de impacto das ações antrópicas vêm sendo utilizados (KNOEPP et al., 2000; DEGENS et al., 2000; DINESH et al., 2003; NOGUEIRA et al., 2006; FRAZÃO et al., 2010; SALAZAR et al., 2011). Contudo, o estudo das interações entre os atributos biológicos, físicos e químicos do solo relacionados com

o tempo de recuperação de áreas reflorestadas é escasso (CHABRERIE et al., 2003; CHODAK; PIETRZYKOWSKI; NIKLIŃSKA, 2009).

Os atributos microbiológicos são utilizados no estudo da melhoria das condições do solo e das mudanças do equilíbrio do sistema edáfico. Principalmente por essas mudanças serem responsivas à decomposição do material orgânico (p. ex. serapilheira), à produção de biomassa microbiana e a outros atributos microbiológicos que se relacionam com atributos físicos do solo como estabilidade dos agregados (WRIGHT UPADHYAYA, 1998, NOGUEIRA et al., 2006, PENGTHAMKEERATI; MOTAVALLI; KREMER, 2011). Respiração do solo, qCO_2 , biomassa, atividade enzimática e diversidade biológica são importantes indicadores de qualidade edáfica (SCHOENHOLTZ; MIEGROET; BURGER, 2000; DINESH et al., 2003, MARINARI et al., 2006). Esses indicadores variam com as mudanças ambientais como temperatura e umidade, além de se modificarem com o tempo de recuperação e com o manejo (WILKINSON et al., 2002, DINESH et al., 2003). A microbiota também é afetada pelos atributos físicos e químicos do solo. A quantidade e qualidade do material orgânico, a concentração de nutrientes como P e N, o pH, a textura e a compactação do solo podem modificar a composição e a atividade das comunidades de fungos e bactérias do solo (SARATHCHANDRA et al., 2001; CHODAK; NIKLIŃSKA, 2010; PENGTHAMKEERATI; MOTAVALLI; KREMER, 2011)

Atributos microbiológicos e bioquímicos do solo possuem relação com o desenvolvimento do solo, estoque de nutrientes, ciclagem e atividade biológica. São os primeiros a sofrerem alteração durante a degradação (SALAZAR et al., 2011) e, conhecer o seu comportamento é essencial para entender o processo de recuperação e sustentabilidade. Biomassa microbiana e respiração do solo têm sido utilizadas com êxito para comparar diferenças texturais, manejo e também para comparar diferenças quanto ao gradiente de recuperação (CHODAK; NIKLINSKA, 2010, QIN et al., 2010). Enzimas, como desidrogenase e urease, fosfatases e celulasas também têm sido utilizadas (CHU et al., 2007; QIN et al., 2010; CHODAK; NIKLIŃSKA, 2010; SALAZAR et al., 2011). Essas enzimas estão envolvidas na ciclagem de nutrientes dos principais elementos como C, N e P e o estudo das mesmas é importante para conhecer os processos ecológicos, a disponibilidade e a perda de nutrientes.

A diversidade microbiana é um importante aspecto da recuperação do solo por estar relacionada com a resiliência e com a sustentabilidade. DGGE (Denaturing, Gradient Gel Eletrophoresis) e T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) têm sido utilizados para acessar as alterações da diversidade microbiana devido a manejo e uso da terra (NOGUEIRA et al., 2006; OKUBO; SUGIYAMA, 2009). A análise de T-RFLP possui vantagem em relação à outra técnica por maior versatilidade, maior número de bandas, melhor resolução e menor interferência da reação em cadeia da polimerase (PCR) (OKUBO; SUGIYAMA, 2009; RETTEDAL.; CLAY; BRÖZEL 2010).

A textura, a diversidade de plantas, tempo de recuperação e outros aspectos ambientais influenciam nos atributos microbianos. Contudo, é difícil encontrar homogeneidade de solos, tipos de plantas e histórico de manejo, especialmente em práticas de recuperação. Além do mais, a floresta Atlântica e as florestas ripárias têm sido extremamente impactadas e fragmentadas com grande perda de diversidade e das funções ecológicas (RIBEIRO et al., 2009).

Nossa hipótese de trabalho é que existem atributos microbiológicos ou bioquímicos do solo que sejam mais relacionados com o tempo de recuperação ou mais dependentes das características edáficas e sazonais. Desse modo, o objetivo desse trabalho foi comparar os atributos microbiológicos e a estrutura de comunidade de Bactéria de uma floresta nativa (NT) de mata ciliar com áreas em diferentes estádios de recuperação (20, 10 e 5 anos) em duas estações (verão e inverno). Sabendo-se que o teor de argila foi semelhante entre os solos das áreas NT e R10 e entre R20 e R05, buscou-se verificar a influência dos atributos físicos sobre as alterações das características microbiológicas entre as áreas e também determinar relações entre os atributos físicos, químicos e microbiológicos.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Material e Métodos

2.2.1.1 Histórico e coleta de amostras

As áreas deste estudo pertencem ao Bioma Mata Atlântica e são reconhecidas como fragmentos da floresta Estacional Semidecídua, com clima Cwa, com média de 1.100 a 1.700 mm de chuvas anuais. As áreas escolhidas estão localizadas em diferentes municípios do estado de São Paulo, Brasil sendo: i) uma

área nativa - controle (NT) conhecida como Mata Ribeirão Cachoeira, localizada no município de Campinas, na área de proteção ambiental de Souza (22°49'42"S 46°55'34"W), *ii*) uma área em recuperação há 20 anos (R20), localizada em Iracemápolis (22°34'38.27"S 47°30'27.62"W), *iii*) uma área em recuperação há 10 anos (R10) localizada em Santa Barbara d'Oeste (22°49'06"S 47°24'52.89"W); e *iv*) uma área em recuperação há 5 anos (R05) localizada em Piracicaba (22°42'02"S 47°38'32"W) (APÊNDICE A). Todas as três áreas em recuperação foram anteriormente plantações de cana-de-açúcar.

Os solos foram classificados segundo World Reference Base for Soil Resource (WRB) (FAO, 2006) e Embrapa (2006) sendo: NT (*Acrisol*) (Argissolo Vermelho Amarelo), R20 (*Ferralsol*) (Latossolo Vermelho Distroférico), R10 (*Lixisol*) (Argissolo Amarelo) e R05 (*Nitisol*) (Nitossolo Vermelho Eutroférico).

A área NT possui 234 ha e denso dossel (20-30 m) formado em geral por 11 famílias: [Myrtaceae (14 espécies), Rutaceae e Fabaceae (13), Solanaceae (9), Rubiaceae (8), Moraceae, Meliaceae e Euphorbiaceae (7), Lauraceae e Mimosaceae (6)] que correspondem a 58% das espécies amostradas (SANTOS; KINOSHITA, 2003; AMAZONAS et al., 2011). R20 é formada por uma área de 50 ha, dossel com aproximadamente 8 m de altura e foi plantada com 140 espécies, maioria nativa, em plantio 3x3 (AMAZONAS et al., 2011). A área R10 formada por uma área de aproximadamente 10 ha foi replantada com 80 espécies nativas em plantio 3x2 m e possui dossel pouco denso com altura entre 5-8 m e presença de gramíneas. A área R05 compreende aproximadamente 5 ha com plantio de espécies semelhantes às da área R10 em plantio 3x3 e também possui invasão por gramíneas devido a baixa densidade do dossel. Algumas espécies arbóreas comuns encontradas nas quatro áreas foram: *Aspidosperma ramiflorum* Müll. Arg., *Centrolobium tomentosum* Benth, *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kunth., *C. legalis* (Mart.) Kunth., *Cedrella fissilis* Vell., *Balfourodendron riedelianum* (Engl.) Engl., *E. leiocarpa* Engl., *Citharexylum myrianthum* Cham.

Cada uma das áreas foi demarcada em quadrantes de 10 x 10 m dentre os quais foram escolhidos 15 quadrantes aleatoriamente para as amostragens. Foram coletadas amostras nos 15 pontos, sendo cada um deles um ponto amostral. As amostras de solo foram coletadas na profundidade de 0-20 cm, peneiradas em 2 mm (mesh) e armazenadas em câmara fria (4°C). Alíquotas de cada amostra foram separadas para a análise molecular e mantidas em freezer a -80°C. Em cada uma

das áreas foram realizadas duas coletas: verão (Janeiro) e inverno (Junho) (Figura 2.1).

Figura 2.1 - Precipitação, temperatura média e indicação das épocas de coleta da região em que se localizam as quatro áreas de estudo

2.2.1.2 Análise dos Atributos Físicos e Químicos do Solo

A análise física foi feita de acordo com o protocolo descrito pela Embrapa (1997), sendo avaliadas umidade, densidade, macroporosidade e microporosidade. Para a densidade, macro e microporosidade, foram coletadas amostras indeformadas em anéis volumétricos de 5cm de diâmetro e 5cm de altura, na profundidade de 0-5cm. A percentagem de umidade foi calculada pela diferença entre 10g de solo fresco e o seco a 105 °C por 24 horas. Na análise granulométrica, as frações areia foram separadas por meio de peneiramento, e silte e argila por sedimentação. Os quinze pontos por área foram reunidos em três amostras compostas para análise da textura e somente foram utilizadas para confirmar as diferenças entre as áreas.

A argila foi determinada através da leitura do densímetro e o silte pela diferença entre a amostra total e os volumes estimados de areia e argila. Os resultados foram utilizados para se determinar a classificação do solo, através do uso do triângulo textural, conforme descrito pela Embrapa (1997). Como as áreas não foram modificadas ou manejadas ao longo do experimento, as análises físicas

como densidade, macroporosidade, microporosidade e textura foram realizadas somente no verão e a umidade do solo foi avaliada nas duas épocas de estudo.

A análise química do solo foi feita seguindo as metodologias descritas em Raji et al. (2001) sendo verificado: pH do solo em KCl e em H₂O, fósforo disponível (resina), carbono e nitrogênio total do solo pelo método de combustão total, utilizando o analisador elementar LECO-CN 2000. O solo foi peneirado em peneiras de 2 mm, seco ao ar e moído para a leitura no aparelho. Os teores de N-NH₄⁺ e N-NO₃⁻ do solo foram avaliados por destilação utilizando solo úmido (KEENEY; NELSON, 1982). As análises de carbono e nitrogênio totais e também de N-NH₄⁺ e de N-NO₃⁻ foram feitas nas duas épocas e, as demais, somente no verão para caracterizar o solo de cada área, e não foram utilizadas nas análises estatísticas. Características físicas e químicas dos solos nas quatro áreas podem ser vistas nas Tabelas 2.1 e 2.2.

Tabela 2.1 - Atributos físicos e químicos dos solos da floresta nativa (NT) e das áreas em recuperação R20, R10 e R05. Valores médios (n= 3 para silte, argila e areia e n=15 para as demais) e desvio padrão são apresentados. Para densidade, macroporosidade e microporosidade valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si (Tukey $p \leq 0,05$)

Variáveis	NT	R20	R10	R05
Densidade (g cm^{-3})	1.33 $\pm$ 0.15 b	1.37 $\pm$ 0.09b	1.57 $\pm$ 0.10 a	1.58 $\pm$ 0.07a
Macroporosidade ($\text{m}^3 \text{m}^{-3}$)	0.21 $\pm$ 0.06a	0.1 $\pm$ 0.04b	0.09 $\pm$ 0.04b	0.05 $\pm$ 0.02c
Microporosidade ($\text{m}^3 \text{m}^{-3}$)	0.27 $\pm$ 0.07c	0.41 $\pm$ 0.03a	0.32 $\pm$ 0.02b	0.41 $\pm$ 0.02a
Silte (g kg^{-1})	137 $\pm$ 33.5	71 $\pm$ 28.6	54 $\pm$ 29.5	135 $\pm$ 21.08
Argila (g kg^{-1})	251 $\pm$ 0.01	584 $\pm$ 38.2	301 $\pm$ 50	534 $\pm$ 28.87
Areia total (g kg^{-1})	612 $\pm$ 33.5	345 $\pm$ 62.45	646 $\pm$ 62.7	331 $\pm$ 43.7
pH H_2O (1:1)	5.16 $\pm$ 0.57	5.01 $\pm$ 0.49	5.64 $\pm$ 0.24	5.26 $\pm$ 0.24
pH KCl (0,01M)	4.46 $\pm$ 0.69	4.25 $\pm$ 0.22	4.71 $\pm$ 0.29	4.41 $\pm$ 0.28
H+Al ($\text{mmol}_c \text{dm}^{-3}$)	53.87 $\pm$ 20.26	33.7 $\pm$ 3.74	80.2 $\pm$ 25.45	61.07 $\pm$ 10
Al ³⁺ ($\text{mmol}_c \text{dm}^{-3}$)	5.16 $\pm$ 2.22	2.25 $\pm$ 0.83	4.5 $\pm$ 3.28	1.85 $\pm$ 0.3
* ¹ CTC ($\text{mmol}_c \text{dm}^{-3}$)	218.37 $\pm$ 37.8	100.47 $\pm$ 11.4	305.8 $\pm$ 41.9	154.8 $\pm$ 20.2
K ⁺ ($\text{mmol}_c \text{dm}^{-3}$)	117.1 $\pm$ 33.87	40.13 $\pm$ 12.91	195.4 $\pm$ 39.16	43.5 $\pm$ 16.94
Ca ²⁺ ($\text{mmol}_c \text{dm}^{-3}$)	36.53 $\pm$ 24.68	17.87 $\pm$ 4.72	22.7 $\pm$ 15.43	39.7 $\pm$ 12.95
Mg ²⁺ ($\text{mmol}_c \text{dm}^{-3}$)	10.87 $\pm$ 3.87	8.8 $\pm$ 2.78	7.53 $\pm$ 4.76	10.53 $\pm$ 3.0
* ² SB ($\text{mmol}_c \text{dm}^{-3}$)	164.5 $\pm$ 52.55	66.8 $\pm$ 10.97	225.6 $\pm$ 49.38	93.73 $\pm$ 22.2
* ³ P disponível (mg dm^{-3})	13.14 $\pm$ 3.73	4.53 $\pm$ 1.2	22.87 $\pm$ 10.0	16.27 $\pm$ 8.12

Tabela 2.2 - Carbono e nitrogênio total, umidade, N-NO₃ e N-NH₄ das quatro áreas nas duas épocas de estudo (verão e inverno). Valores médios (n=15) e desvio padrão são apresentados. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si (Tukey $p \leq 0,05$)

Áreas		NT	R20	R10	R05
Carbono total (%)	Verão	3,9 $\pm$ 1,0a	2,4 $\pm$ 0,5b	2,3 $\pm$ 0,47bc	1,9 $\pm$ 0,16c
	Inverno	4,2 $\pm$ 1,7a	2,7 $\pm$ 0,4b	2,7 $\pm$ 0,6b	2,3 $\pm$ 0,2b
Nitrogênio total (%)	Verão	0,34 $\pm$ 0,13a	0,16 $\pm$ 0,03b	0,11 $\pm$ 0,04c	0,15 $\pm$ 0,02b
	Inverno	0,39 $\pm$ 0,13a	0,15 $\pm$ 0,03b	0,16 $\pm$ 0,04b	0,14 $\pm$ 0,02b
Umidade (%)	Verão	17,5 $\pm$ 4,5c	21,9 $\pm$ 2,1b	16,1 $\pm$ 1,7c	23,4 $\pm$ 4,8a
	Inverno	11,7 $\pm$ 2,1b	17,6 $\pm$ 1,1a	8,5 $\pm$ 1,4c	18,6 $\pm$ 2,1a
N-NO ₃ ($\mu\text{g g}^{-1}$ solo seco)	Verão	18.39 $\pm$ 6.81a	9.67 $\pm$ 3.61b	5.91 $\pm$ 2.8c	2.68 $\pm$ 1.93d
	Inverno	5.6 $\pm$ 2.54a	2.3 $\pm$ 2.06b	2.3 $\pm$ 2.58b	1.8 $\pm$ 1.2b
N-NH ₄ ($\mu\text{g g}^{-1}$ solo seco)	Verão	8,05 $\pm$ 7,0ns	5,62 $\pm$ 4,2ns	7,62 $\pm$ 5,06ns	3,27 $\pm$ 2,5ns
	Inverno	12,92 $\pm$ 8,62a	5,25 $\pm$ 1,88b	8,26 $\pm$ 2,83a	8,53 $\pm$ 3,68a

2.2.1.3 Análise Microbiológica

Para determinação do carbono da biomassa microbiana (CBM) das amostras de solo foi utilizado o método de fumigação-extração (VANCE; BROOKES; JENKINSON, 1987) utilizando coeficiente de conversão de $k_c=0,4$ (KASCHUK; ALBERTON; HUNGRIA, 2010) nos cálculos. A atividade microbiana foi determinada através da respiração basal ($C-CO_2$) em amostras de 50g de solo incubadas por 20 dias a $28^\circ C$. O CO_2 liberado foi capturado em solução de NaOH 50 mmol, precipitado com solução de $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, e quantificado por titulação do NaOH remanescente com HCl 50 mmol, na presença de fenolftaleína (ALEF, 1995). A partir dos resultados de CBM e do carbono total, foi calculado o quociente metabólico (qCO_2), que representa a taxa de liberação de $C-CO_2$ por unidade de C da biomassa microbiana.

O nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) foi determinado seguindo o método de fumigação-extração, sendo quantificado pelo método da ninhidrina (JOERGENSEN; BROOKES, 1990) utilizando-se o coeficiente de conversão $k_n = 0,54$ (KASCHUK; ALBERTON; HUNGRIA, 2010). As enzimas analisadas foram desidrogenase (CASIDA; KLEIN; SANTORO, 1964), urease (EC 3.5.1.5.) (TABATABAI; BREMNER, 1972), celulase (EC 3.2.1.4) (SCHINNER; VON MERSI, 1990) e fosfatase ácida (TABATABAI; BREMNER, 1969). A fosfatase ácida, apesar de ser afetada pelo pH do solo foi incluída neste trabalho devido à importância para a ciclagem de nutrientes e influência sobre a microbiota (SALAZAR et al., 2011).

2.2.1.4 Análise T-RFLP

As quinze amostras de cada área foram reunidas em cinco subamostras formando três amostras compostas. O DNA de cada uma dessas foi extraído seguindo recomendações do kit Power Soil DNA Extraction (MoBio Carlsbad, CA). Para a verificação da integridade e quantificação do DNA extraído, uma alíquota de 5 μl foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando 2 μl de Low mass DNA Ladder (Invitrogen Technology).

Para as reações de amplificação do gene 16S rRNA de Bacteria foram utilizados os primers universais 27f e 1492r (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995). Para a detecção de fluorescência na análise de T-RFLP, a extremidade 5' do primer 27f foi marcada com 6-carboxifluoresceína (FAM). A amplificação foi feita em

solução contendo: 2 µl de tampão PCR 10x, 1 µl MgCl_2 50mM, 0.5 µl de dNTP 10mM, 0.25 µl BSA 1ng μl^{-1} , 0.2 µl de Taq polimerase 5U. μl^{-1} ; 0.5 µl de cada primer a 5 pmol, e 5 µl de amostra DNA do solo, água ultrapura (Milli-Q) esterilizada para volume final de 25 µl. As reações de amplificação foram feitas de acordo com a seguinte programação do termociclador: 94°C por 3 min., 35 ciclos de 94°C por 30 s., 59 °C por 45 s. e 72 °C por 1 min. e uma extensão final de 72 °C por 15 min. Para a purificação dos produtos de PCR foi utilizado o kit GFX TM PCR DNA (GE HealthCare) seguindo as instruções do fabricante.

Os produtos de PCR de Bacteria purificados foram utilizados nas reações de restrição com endonucleases HhaI (GCG[^]C) e MspI (C[^]CGG), as quais apresentam melhores resultados para o uso em T-RFLP para Bacteria (MARSH, 1999). Nas reações foram utilizados 1,5 µl de Buffer React 10 X, 0.15 µl de BSA 1 ng μl^{-1} , 0.06 µl da endonuclease 10 U μl^{-1} (Invitrogen), 5 µl do produto purificado de PCR e água ultrapura (Milli-Q) para o volume final de 15 µl. As reações foram feitas em termociclador a 37 °C por 3 horas e 68 °C por 10 minutos, sendo o segundo passo usado para a inativação das endonucleases. Após a reação de restrição os produtos digeridos foram precipitados em etanol e analisados em um sequenciador automático ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems). O produto precipitado foi ressuspenso em mistura contendo 9.75 µl de Formamida HiDi e 0.25 µl de padrão de comprimento GeneScan TM -500 ROX TM Size Standard (Applied Biosystems).

Os dados obtidos foram verificados quanto à qualidade dos picos (Peak Scanner V1.0 Applied BioSystems, Foster City, CA). Uma linha base de 50 unidades de fluorescência foi usada para discriminar os picos verdadeiros dos ruídos provenientes da técnica, e UTO (unidades taxonômicas operacionais) menores que 50 e maiores que 800 pb foram eliminados de todos os dados (CULMAN et al., 2008). Os dados de altura dos picos (unidades de fluorescência) foram transformados em dados relativos sendo apresentados como valores percentuais de detecção. Os valores calculados dos dados relativos, referentes aos UTO formados, foram transformados em matriz de distância de *Bray- Curtis*.

2.2.1.5 Análise Estatística

Para avaliar as diferenças e relações entre os parâmetros biológicos, físicos e químicos das áreas estudadas foram usados ANOVA e o teste de *Tukey* ($p \leq 0.05$) e correlação de *Pearson*. Todas estas análises foram realizadas utilizando o aplicativo

SAS 9.2 (SAS Institute, 1999). Alguns dados foram transformados para garantir a normalidade e a homogeneidade de variância.

A fim de verificar o efeito dos atributos físicos e químicos sobre os atributos microbiológicos nas duas épocas de coleta foi utilizada análise de redundância canônica (RDA) e teste de permutação de Monte Carlo ($p < 0,05$) por meio do aplicativo Canoco para Windows 4.5 (TER BRAAK; SMILAUER, 1988). Nesta análise, os atributos microbiológicos foram utilizados como variáveis respostas e os atributos físicos e químicos como variáveis explicativas e o modo *forward selection* ($p \leq 0,05$) para encontrar os atributos mais discriminantes.

A matriz de *Bray-Curtis* formada a partir do perfil de UTO foi submetida à análise de similaridade (ANOSIM) e a teste não paramétrico Escalonamento Multidimensional Não Métrico (NMDS), para determinar a diferença estatística entre os tratamentos, utilizando o programa Primer 5.

2.2.2 Resultados

2.2.2.1 Atributos Físicos e Químicos do Solo

O teor de areia, argila e também a microporosidade foram semelhantes entre as áreas NT e R10 (médio argiloso) e entre R20 e R05 (argiloso) (Tabela 2.1). A macroporosidade, densidade e também carbono e nitrogênio totais acompanharam o gradiente de recuperação (Tabelas 2.1 e 2.2). Observa-se alta compactação dos solos das áreas mais novas (Tabela 2.1).

A densidade e a microporosidade tiveram correlação negativa com o carbono (verão $r = -0,42$ $p \leq 0,0008$; inverno $r = -0,54$ $p \leq 0,0001$) e com o nitrogênio (verão $r = -0,34$ $p \leq 0,0092$; inverno $r = -0,27$, $p \leq 0,04$) totais do solo. A macroporosidade teve alta correlação positiva com o carbono (verão $r = 0,67$ $p \leq 0,0001$; inverno $r = 0,55$ $p \leq 0,0001$) e com o nitrogênio (verão $r = 0,61$ $p \leq 0,0001$; inverno $r = 0,66$ $p \leq 0,0001$). A umidade nas áreas NT e R10 foi 33 e 47 %, respectivamente, menor no inverno e nas áreas R20 e R05, apenas 20 % menor (Tabela 2.2). Portanto, a umidade explica as características de textura dos solos.

O teor de nitrato foi maior na NT nas duas épocas, sendo a diferença entre as áreas mais destacada no verão (Tabela 2.2). O teor do nitrato também teve correlação com o carbono (verão $r = 0,77$ $p \leq 0,0001$; inverno $r = 0,32$ $p < 0,02$) e nitrogênio (verão $r = 0,64$ $p \leq 0,0001$; inverno $r = 0,45$ $p \leq 0,001$) totais do solo; a

densidade (verão $r=-0,52$; $p\leq 0,0001$; inverno $r=-0,31$ $p\leq 0,02$), microporosidade (verão $r=-0,49$; $p\leq 0,0001$; inverno $r=-0,44$ $p\leq 0,001$) e macroporosidade (verão $r=0,70$; $p\leq 0,0001$; inverno $r=0,49$ $p\leq 0,0001$). No entanto, o teor de amônio não apresentou nenhum padrão em relação ao estágio de recuperação das áreas (Tabela 2.2).

2.2.2.2 Os atributos microbiológicos e suas interações

Os atributos microbiológicos que variaram de acordo com o gradiente de recuperação, independentemente da textura ou das variações sazonais foram CBM e urease (Tabela 2.3). Respiração basal e atividade da desidrogenase variaram de acordo com a idade de recuperação somente no verão e celulase somente no inverno (Tabela 2.3). A atividade da desidrogenase acompanhou as diferenças texturais entre os solos, no inverno.

Considerando somente os atributos microbiológicos, a desidrogenase apresentou correlação com todos os outros atributos microbiológicos, especialmente no verão (Tabela 2.4). A atividade da celulase teve correlação somente com a respiração basal, urease e desidrogenase, no inverno. A atividade da desidrogenase e da urease tiveram correlação com a maioria dos atributos e destacam-se principalmente as relações com a respiração basal, com o CBM e com o NBM. A atividade da fosfatase ácida foi relacionada somente com o NBM nas duas épocas de coleta.

A fim de entender o comportamento dos atributos microbiológicos em todas as áreas quanto à diferença de textura foi calculada uma correlação entre os atributos microbiológicos com os atributos físicos e químicos. A atividade da desidrogenase se correlacionou com todos os atributos físicos e químicos analisados. Destaca-se a alta correlação negativa entre essa enzima, e a umidade e a microporosidade e positiva com a macroporosidade, carbono do solo, nitrogênio do solo e $N-NO_3$ (Tabela 2.5). A microporosidade correlacionou-se negativamente com o NBM, mas não com CBM, e com a macroporosidade correlacionou-se positivamente com a biomassa microbiana e com a atividade da urease. Carbono do solo, nitrogênio do solo e $N-NO_3$ correlacionaram com todos os atributos microbianos. Por outro lado $N-NH_4$ se correlacionou somente com a respiração basal, no inverno, e com a desidrogenase no verão. pH (H_2O) correlacionou-se

negativamente com a atividade da fosfatase ácida e o conteúdo do fósforo do solo não se correlacionou com nenhum dos atributos microbiológicos.

A análise de redundância mostrou o efeito dos atributos físicos e químicos sobre as propriedades microbiológicas tanto no verão quanto no inverno (teste de permutação de Monte Carlo $P < 0.002$). No verão, o eixo 1 explicou 73,5 %, sendo responsável por quase a totalidade da explicação da variabilidade e o eixo 2 por apenas 11,8 %. As variáveis ambientais explicaram 45,3% da variabilidade total (Figura 2.2 A). No inverno o eixo 1 e 2 explicaram 48,9 % e 30 % da variabilidade, respectivamente, sendo que as variáveis ambientais explicaram 44,8 % da variabilidade total (Figura 2.2 B). A partir do método de Forward Selection, as variáveis SoCarb, pH(H₂O), umidade e microporosidade foram selecionadas como significativas ($P < 0,05$) no verão e, no inverno, foram SoNitr, umidade, pH(H₂O) e N-NH₄. A maioria dos atributos microbiológicos se relacionou com a área NT nas duas estações e com grande influência do SoNitr, SoCarb, e N-NO₃ (Tabela 2.5). Importante variação sazonal foi observada em relação ao conteúdo de fósforo e ao pH e à umidade (Figura 2.2).

Tabela 2.3 - Atributos Microbiológicos referentes às duas épocas de coleta. Variáveis seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Tukey $p \leq 0.05$), dentro da mesma época de coleta

Atributos Microbiológicos	Verão				Inverno			
	NT	R20	R10	R05	NT	R20	R10	R05
qCO_2 ($\mu g CO_2 \mu g CBM^{-1} dia^{-1}$)	0,53 ns^*	0,55 ns	0,58 ns	0,62 ns	0,35ab	0,23b	0,44a	0,33ab
Respiração Basal ($\mu g CO_2 g^{-1} solo dia^{-1}$)	101,24a	71,99b	58,89bc	47,19c	85,6a	49,6b	54,8b	49,74b
Carbono da Biomassa Microbiana ($\mu g C g^{-1} solo$)	209,94a	172,43a	109,35b	104,18b	243,2a	220,13a	167,95b	137,86b
Nitrogênio da Biomassa Microbiana ($\mu g N g^{-1} solo$)	92,41a	40,24b	35,78b	35,21b	31,19a	16,65b	15,08b	22,12b
Urease ($\mu g N g^{-1} solo$)	185,41a	134,12a	83,25b	90,61b	220,15a	200,7ab	172,97bc	147,16c
Fosfatase Ácida (mg de p-nitrofenol $kg^{-1} hora^{-1}$)	6198,67a	3502,9b	3266,1b	3546,8b	7953,3a	4299,4b	4064,5b	4481,1b
Desidrogenase ($\mu g TTF g^{-1} solo$)	25,75a	10,44b	9,47b	6,02c	20,35a	8,33b	19,37a	4,01b
Celulase (mgAR $g^{-1} solo$)	430,25a	312,52a	82,16b	176,55a	141,15a	85,28ab	94,71ab	41,8b

* ns – não significativo

Tabela 2.4 - Coeficiente de correlação entre os atributos microbiológicos nas duas épocas de coleta (verão/inverno)

Atributos	Respiração Basal	CBM	NBM	Urease	Fosfatase Ácida	Desidrogenase
CBM	<i>ns</i>					
NBM	0,47**/0,43*	0,63**/0,58**				
Urease	0,43/0,42*	0,55**/0,42*	0,44*/ <i>ns</i>			
Fosfatase Ácida	<i>ns</i>	<i>Ns</i>	0,53**/0,44*	<i>ns</i>		
Desidrogenase	0,57**/ <i>ns</i>	0,54**/ <i>ns</i>	0,70**/ <i>ns</i>	0,45*/ <i>ns</i>	0,56**/ <i>ns</i>	
Celulase	<i>ns</i> /0,50**			<i>ns</i> /0,45*	<i>ns</i>	<i>ns</i> /0,44*

**p≤0,0001 * p<0,001

Tabela 2.5 - Coeficiente de correlação entre os principais atributos físico-químicos e microbiológicos nas duas épocas de coleta (verão/inverno)

Atributos	Respiração Basal	NBM	CBM	Urease	Fosfatase Ácida	Desidrogenase
Umidade	<i>ns</i>	<i>Ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	-0,46*/-0,72**
Densidade	<i>ns</i>	-0,42*/ <i>ns</i>	-0,47*/-0,45*	-0,47**/ <i>ns</i>	<i>ns</i>	-0,45*/ <i>ns</i>
Microporosidade	<i>ns</i>	-0,52**/ <i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	-0,58/-0,67**
Macroporosidade	0,45*/0,48**	0,65**/ <i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0,48/0,48**	0,67**/ <i>ns</i>
Carbono do Solo	0,57/0,64**	0,68/0,56**	0,56/0,51**	0,45/0,46*	0,58**/0,45*	0,92**/0,45*
Nitrogênio do Solo	0,44/0,65**	0,71/0,63**	<i>ns</i> /0,54**	<i>ns</i> /0,47*	0,49/0,57**	0,78/0,52**
N-NO₃	0,48*/ <i>ns</i>	0,69**/ <i>ns</i>	0,55**/ <i>ns</i>	0,48**/ <i>ns</i>	0,54**/ <i>ns</i>	0,82**/ <i>ns</i>
N-NH₄	<i>ns</i> /0,53**	<i>Ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0,52**/ <i>ns</i>
pH H₂O	<i>ns</i>	<i>Ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i> /-0,43*	<i>ns</i>

**p≤0,0001 * p≤0,001

Figura 2.2 - Análise de Redundância entre atributos microbiológicos e físicos ou-químicos no verão (A) e no inverno (B). Flechas cinzentas pontilhadas representam as variáveis microbiológicas com as seguintes denominações ou abreviações: qCO_2 , Respiração Basal (Resp), Desidrogenase, Fosfatase Ácida (FosfaAc), Urease, Celulase, Carbono da Biomassa Microbiana (CBM) e Nitrogênio da Biomassa microbiana. Flechas negras representam as variáveis físicas e químicas com as seguintes denominações ou abreviações: $N-NH_4$, $N-NO_3^-$, Carbono total do Solo (SoCarb), nitrogênio total do solo (SoNitr), umidade, microporosidade, densidade, fósforo do solo (SoP), pH (KCl) e pH (H_2O). As flechas cinzentas representam os centróides das áreas adicionadas como variáveis suplementares no modelo

2.2.2.3 T-RFLP

As análises estatísticas de Anosim e NMDS, tendo como base os perfis gerados pela técnica de T-RFLP para o domínio Bacteria (Tabela 2.6, Figura 2.3), mostraram a separação entre as áreas estudadas (NT, R20, R10 e R05) no verão ($p < 0.1$), sendo que todas as áreas foram discriminadas entre si ao se utilizar a enzima HhaI e a as NT e R20 foram diferentes das áreas mais novas ao se utilizar a enzima MspI (Figura 2.3) (Tabela 2.6). Os valores de stress entre 0,07 e 0,12 confirmam a confiabilidade em separar as áreas pelo perfil de UTO. No inverno não houve diferenças entre as áreas estudadas para nenhuma endonuclease utilizada (Figura 2.2).

Tabela 2.6 - Valores de R do teste de comparação entre os UTOs referentes à análise de T-RFLP e as enzimas (HhaI e MspI), para as duas épocas de amostragem

Areas	Verão		Inverno	
	HhaI	MspI	HhaI	MspI
R05xR10	0.63*	0.96*	0.37	0.11
R05xR20	0.67*	0.78*	0.037	0.44
R05xNT	0.59*	0.48*	0.593	0.22
R10xR20	0.96*	0.74*	0.29	0.037
R10xNT	0.70*	0.67*	-0.11	0
R20xNT	0.85*	0.44	0.48	0.37
Global R	0.64**	0.67**	0.34	0.24

* $p \leq 0.1$ ** $p \leq 0.02$

Figura 2.3 - Análise do escalonamento multidimensional não paramétrico (NMDS) das UTOs (Unidades taxonômicas Operacionais) referentes à diversidade de Bactéria das quatro áreas (NT, R20, R10 e R05), utilizando as enzimas HhaI (A, Verão e B, Inverno) e MspI (C, Verão e D, Inverno)

2.2.3 Discussão

Independentemente da textura, a macroporosidade e a densidade acompanharam o gradiente de recuperação (Tabela 2.1). Áreas em estádios de recuperação mais avançados geralmente possuem menor densidade e maior macroporosidade devido à ação das raízes, da fauna edáfica e do acúmulo de matéria orgânica (SIX et al., 2004; TEJADA et al., 2006).

No presente trabalho, a variação entre 1,3 e 1,5 g cm⁻³ da densidade mostra a relação negativa entre densidade do solo e a biomassa microbiana e a atividade enzimática da urease e da desidrogenase (Tabela 2.5). Pengthamkeerati; Motavalli; Kremer (2011) encontraram em ambientes com compactação severa (densidade acima de 1,8 Mg m⁻³), efeito negativo da densidade do solo sobre a biomassa microbiana. O aumento da densidade e da compactação do solo com redução dos

macroporos e aumento de microporos pode reduzir as populações de fungos e bactérias e também a atividade enzimática devido à redução da aeração e da disponibilidade de nutrientes e, portanto, afetar negativamente o processo de recuperação (DE NEVE; HOFMAN, 2000; LI; MA; ZHANG, 2002; HEMMAT et al., 2010).

A umidade foi um fator importante em conjunto com a microporosidade para unir as áreas R05 e R20. Esse atributo é afetado diretamente pela microporosidade e pela textura, as quais estão relacionadas com a retenção de água e com as trocas gasosas (SCHOENHOLTZ; MIEGROET; BURGER, 2000). De acordo com Li; Ma e Zhang (2002), a compactação (inferior ou superior a $1,3 \text{ Mg m}^{-3}$) e a redução da porosidade tendem a causar um efeito negativo sobre a microbiota devido à redução das trocas gasosas e em virtude do preenchimento dos poros por água. Essas influências da umidade (indiretamente da microporosidade) e do carbono do solo sobre os atributos microbianos podem ser observadas pela alta correlação representada na RDA (Figura 2.2). No inverno, a maior influência do eixo 2 na separação das áreas se deve ao maior efeito da umidade do solo (influenciada pela textura) em comparação com as outras variáveis microbiológicas como desidrogenase e nitrogênio da biomassa microbiana, no eixo 1 (Figura 2.2).

O nitrato do solo, nas duas épocas, mostra maior taxa da mineralização nas áreas mais antigas, principalmente no verão (Tabela 2.2). Nessa época, observa-se, de modo geral, maior atividade microbiana, provavelmente em virtude da maior temperatura e da maior disponibilidade de água (PRADO; AIROLDI, 1999; WILKINSON et al., 2002). Essa maior atividade microbiana na época chuvosa parece ser acompanhada também de um efeito sazonal sobre os microrganismos oxidantes de amônio. Durante a decomposição da matéria orgânica, o amônio mineralizado é oxidado a nitrato por meio das bactérias nitrificantes. Esse processo ocorre de forma rápida sendo altamente dependente de grupos específicos como Nitrosomonas (oxida amônio a nitrito) e Nitrobacter (oxida nitrito a nitrato) (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Microrganismos do Domínio Archaeae também têm sido reportados como importantes oxidantes de amônio no solo (LEININGER et al., 2006). Maior atividade desses grupos oxidantes deve ter ocorrido no verão devido à maior concentração de nitrato presente nessa época, em relação ao inverno, que possui maior concentração de amônio (Tabela 2.2). É importante que novos estudos

sobre esses grupos sejam feitos para verificar a ligação dos mesmos com a ciclagem de nitrogênio em diferentes estádios de recuperação ambiental e também com o efeito sazonal.

Outro fator que pode contribuir para uma menor concentração de nitrato nas áreas mais novas é a compactação do solo. Silva et al. (2011) observaram, em condições controladas, em dois solos diferentes, Latossolo Vermelho Ácrico (LVA) e Latossolo Amarelo distrófico (LA), queda da biomassa microbiana devido à proteção física do carbono orgânico. Por outro lado, esses autores observaram maior mineralização de N em compactação intermediária (aprox. 450 kpa) e uma redução dessa taxa com o aumento da compactação, com melhores respostas no solo (LVA). No solo LA verificaram menor taxa de mineralização de N e ainda redução do N-NO₃ devido ao efeito da desnitrificação.

A respiração basal mostra a influência da decomposição da matéria orgânica e da atividade microbiana, principalmente no verão, com maior separação das áreas NT das áreas mais novas e a R20 da área R05 (Tabela 2.3). Neste caso, ocorreram duas situações: um efeito sazonal causado pela maior atividade microbiana no verão e um efeito da compactação do solo sobre a proteção do material orgânico. No verão, a área R20 pode ter se aproximado da área NT devido ao efeito sazonal da maior atividade biológica como exsudação radicular, maior atividade microbiana e maior disponibilidade de carbono facilmente decomponível (SCHOENHOLTZ; MIEGROET; BURGER, 2000; CHEN et al., 2007). No inverno, com a redução da atividade microbiana e pela redução de carbono disponível, a respiração da área R20 não diferiu das áreas R10 e R05. Essas áreas mais novas tiveram baixa participação da respiração basal devido ao impacto da compactação na proteção do carbono e na atividade da microbiota (SILVA et al., 2011). A influência da sazonalidade (umidade) e da densidade do solo é corroborado pela análise RDA que mostra maior influência da umidade para separar as áreas no eixo 2, no inverno e da relação negativa da densidade sobre os atributos microbiológicos (Figura 2.2).

Maiores valores CBM foram encontrados nas áreas mais antigas (NT e R20), independentemente da época de coleta e do tipo do solo, contudo o NBM não variou entre as áreas em recuperação (Tabela 2.3). Maiores valores do CBM podem ser indiretamente relacionados com o maior aporte de carbono ao solo, maior número de nichos disponíveis e também com a diversidade vegetal que aumentam com a idade de reflorestamento. A biomassa microbiana possui uma relação direta com a

qualidade e com a quantidade do material orgânico e também com a diversidade vegetal que garantem maior diversidade funcional e abundância da microbiota (YAN; McBRATNEY; COPELAND, 2000; LYNCH et al., 2004; QIN et al., 2010; PENGTHAMKEERATI; MOTAVALLI; KREMER, 2011). Maiores valores de biomassa microbiana também são geralmente encontrados em áreas mais avançadas no estágio sucessional, em virtude das melhores condições físicas e químicas do solo (MARINARI et al., 2006, CHODAK; PIETRZYKOWSKI; NIKLIŃSKA, 2009; CHODAK; NIKLIŃSKA, 2010). A ausência de significância do NBM entre as áreas em recuperação pode indicar limitação nutricional de nitrogênio e menor qualidade do material orgânico da serapilheira nas áreas em recuperação. Isso mostra que as áreas, mesmo a R20, não tiveram ainda um processo de recuperação satisfatório, de modo a se igualar a NT.

Longo; Ribeiro; de Melo (2011) ao avaliarem as alterações promovidas pelo plantio de leguminosas (1, 2 e 3 anos do plantio) em áreas de mineração de cassiterita em uma área de floresta tropical aberta verificaram maior aporte de CBM na área de mata nativa e nas áreas com mais tempo de plantio. Além disso, não encontraram diferenças entre o NBM para as áreas em recuperação, o que indica baixa reserva de N no solo. Esses mesmos autores também verificaram maior atividade da desidrogenase na área nativa e nas áreas plantadas em relação às áreas sem plantio.

A atividade da urease separou as áreas nas duas épocas de coleta e a desidrogenase somente no verão. Alguns trabalhos mostram a sensibilidade da urease e da desidrogenase ao uso intensivo do solo, ocorrendo menor atividade em estágios iniciais de sucessão (BANDICK; DICK 1999; RIFFALDI et al., 2002; MARINARI et al., 2006). O acúmulo da urease no ambiente, devido à sua alta resistência à degradação, por causa da associação com partículas organo-minerais (MAKOI; NDAKIDEMI, 2008) pode ter influenciado na separação das áreas nas duas épocas de coleta e, portanto, ter sofrido menor influência da sazonalidade. A relação negativa entre urease e a densidade se deve ao efeito negativo da compactação sobre a atividade microbiana do solo (SILVA et al., 2011).

A desidrogenase é encontrada somente em células vivas e está relacionada com a transferência de energia através da cadeia transportadora de elétrons (BASTIDA et al., 2006) e possui alta relação com o carbono da biomassa, respiração

basal e carbono do solo (BOLTON; SMITH; LINK, 1993, CHU et al., 2007), como também visto no atual trabalho (Tabelas 2.4 e 2.5). Menores taxas de infiltração de água, aeração e redução da porosidade podem ser fatores que reduzem a atividade enzimática como da desidrogenase (TAN; CHANG; KABZEMS, 2008). A desidrogenase apresentou relação negativa com a densidade, umidade do solo e também com a microporosidade (Figura 2.2, Tabela 2.5). Dick; Myrold; Kerle (1988), em estudos florestais, também reportaram o efeito negativo da densidade sobre a atividade da desidrogenase. Assim, no verão, época em que ocorre maior concentração de chuvas (Figura 2.1), todos os solos estavam saturados em água. Assim, a biomassa microbiana e o carbono total podem ter sido os principais fatores que influenciaram a atividade da desidrogenase e permitiram a separação das áreas por essa enzima. Contudo, no inverno, as áreas menos argilosas (NT e R10) tendem a ter menor retenção de água, o que possibilitou maior atividade da desidrogenase e maior influência da umidade, da microporosidade e da textura.

Não foi encontrada no atual trabalho relação entre as áreas do solo com o qCO_2 . Estádios mais avançados de recuperação geralmente apresentam também menores valores de qCO_2 (INSAM; HASELWANDTER, 1989; ANDERSON; DOMSCH, 1993). Entretanto, Wardle e Ghani (1995) mostraram que esse indicador não confirma a diferença entre distúrbio e estresse e também não se modifica ao longo do gradiente sucessional. Altos valores de qCO_2 podem estar relacionados a maiores concentrações de carbono orgânico disponível para a degradação microbiana (DINESH et al., 2003) ou fatores físicos que afetem a atividade microbiana como umidade, densidade e porosidade.

A atividade da fosfatase ácida não foi capaz de separar as áreas em recuperação (Figura 2.2). Essa enzima, não tem sido considerada eficiente em separar as áreas em recuperação devido a influência do pH e da fertilização sobre sua atividade (TAN; CHANG; KABZEMS, 2008; NAHAS, 2002). Essa enzima é produzida por bactérias e por plantas e está diretamente relacionada com a mineralização de compostos orgânicos e, portanto, sofre indiretamente influência da porosidade e também da concentração de carbono e do nitrogênio do solo, ao depender da atividade dos microrganismos no solo (SALAZAR et al., 2011). Como a fosfatase também é produzida pelas plantas, ambientes com maior diversidade e abundância e maior competição por nutrientes tendem a ter maior atividade (SALAZAR et al., 2011). Isso pode ter contribuído para a maior atividade encontrada

na área NT em relação às áreas em recuperação. A compactação do solo também pode ser um fator importante para causar redução da atividade da fosfatase. Esses fatos podem ser comprovados pela relação entre a fosfatase e os atributos físicos e químicos como macroporosidade e carbono e nitrogênio totais do solo além de certos atributos microbiológicos, como NBM (Figura 2.2, Tabelas 2.4 e 2.5).

No inverno houve diferença entre as áreas quanto ao tempo de recuperação para a atividade da celulase, sendo esta maior na área NT em relação a R05. A atividade de algumas celulasas pode sofrer influência da qualidade da matéria orgânica e da presença e do crescimento das plantas e das variações de temperatura e umidade (DEBOSZ; RASMUSSEM; PEDERSEN, 1999; BANDICK; DICK, 1999). Bandick e Dick (1999) ainda verificaram menor atividade da celulase em solos secos ao ar quando comparados com solos em umidade de campo. Essa relação entre a umidade e a qualidade do material orgânico pode explicar a correlação entre a atividade da celulase e a respiração do solo, atividade da urease e da desidrogenase e a separação entre a área mais nova e a mais antiga, no inverno (Tabela 2.4). Os fungos podem estar exercendo papel importante na atividade enzimática durante a época seca, pois diferentemente das bactérias sobrevivem em pH mais baixo e são mais resistentes à seca e também são responsáveis por até 86 % da celulase produzida no solo (RHEE; HAH; HONG, 1987).

A análise de UTO demonstrou que as duas enzimas utilizadas foram capazes de separar as áreas quanto à diversidade de Bacteria, no verão (Figura 2.3 Tabela 2.6). Esses dados demonstram grande oscilação da comunidade microbiana em relação às variações sazonais. Provavelmente, a diversidade de microrganismos não se relacione diretamente com os estádios sucessionais, como foi observado por Chabrierie et al. (2003). Talvez seja efeito indireto de outros fatores ambientais, como da umidade, da temperatura, da disponibilidade de nutrientes e da cobertura vegetal (CHEN et al., 2007; FIERER et al., 2010).

2.3 Conclusões

- a compactação do solo afetou negativamente os atributos microbiológicos avaliados, principalmente a biomassa microbiana, a atividade microbiana (decomposição) e a atividade da urease.
- A respiração basal do solo foi maior nas áreas mais antigas somente no verão e não diferiu entre os plantios no inverno, indicando efeito sazonal.
- O CBM foi maior nas áreas mais antigas (NT e R20) independentemente do tipo de solo ou das variações sazonais.
- O NBM não variou entre as áreas em recuperação.
- o qCO_2 não foi significativo para verificar influência dos tempos de plantio ou da diferença entre os tipos de solo.
- A atividade da desidrogenase foi capaz de separar as áreas em relação ao tempo de plantio no verão e teve alta relação com os atributos físicos principalmente no inverno.
- a atividade da urease separou as áreas em relação ao tempo de recuperação tanto no verão quanto no inverno com baixa influencia dos atributos físicos do solo avaliados.
- a atividade da fosfatase ácida não separou as áreas em relação ao tempo de plantio e aos atributos físicos do solo, sendo altamente relacionada com os atributos químicos (p.ex. carbono) e microbiológicos (p.ex. biomassa microbiana).
- não foi possível separar as áreas em recuperação quanto à atividade da celulase devido à alta variabilidade dos dados. Influência da sazonalidade sobre a atividade dessa enzima foi constatada
- a estrutura da comunidade de Bacteria variou entre as épocas de coleta e também com a idade das áreas.

Referências

ALEF, K. Soil respiration. In: ALEF, K.; NANNPIERI, P. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. Amsterdam: Academic Press, 1995. p. 234-245.

AMANN, R.L.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cell without cultivation. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 59, n. 1, p. 143-169, 1995.

AMAZONAS, N.T.; MARTINELLI, L.A.; PICCOLO, M.C.; RODRIGUES, R.R. Nitrogen dynamics during ecosystem development in tropical forest restoration. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 262, p. 1551-1557, 2011.

ANDERSON, T.H.; DOMSCH, K.H. The metabolic quotient from CO₂ (qCO₂) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 25, n. 3, p. 393-395, 1993.

BANDICK, A.K.; DICK, R.P. Field management effects on soil enzyme activities. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 31, n. 11, p.1471-1479, 1999.

BASTIDA, F.; ZSOLNAY, A.; HERNANDEZ, T.; GARCIA, C. Past, present and future of soil quality indices: A biological perspective. **Geoderma**, Amsterdam, v. 147, n. 3/4, p. 159-171, 2008.

BOLTON, H.; SMITH, J.L.; LINK, S.O. Soil microbial biomass and activity of a disturbed and undisturbed shrub-steppe ecosystem. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 25, n. 5, p. 545-552, 1993.

CASIDA, L.E.; KLEIN, D.A.; SANTORO, T. Soil dehydrogenase activity. **Soil Science**, Philadelphia, v. 98, p. 371-376, 1964.

CHABRERIE, O.; LAVAL, K.; PUGET, P.; DESAIRE, S.; ALARD, D. Relationship between plant and soil microbial communities along a successional gradient in a chalk grassland in north-western France. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 24, n. 1, p. 43-56, 2003.

CHEN, M.M.; ZHU, Y.G.; SU, Y.H.; CHEN, B.D.; FU, B.J. MARSCHNER, P. Effects of soil moisture and plant interactions on the soil microbial community structure. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 43, n.1, p. 31-38, 2007.

CHODAK, M.; NIKLIŃSKA, M. Effect of texture and tree species on microbial properties of mine soils. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 46, n. 2, p. 268-275, 2010.

CHODAK, M.; PIETRZYKOWSKI, M.; NIKLIŃSKA, M. Development of microbial properties in a chronosequence of sandy mine soils. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 41, n. 3, p. 259-268, 2009.

CHU, H.Y.; LIN, X.G.; FUJII, T.; MORIMOTO, S.; YAGI, K.; HU, J.L.; ZHANG, J.B. Soil microbial biomass, dehydrogenase activity, bacterial community structure in response to long-term fertilizer management. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 39, n. 11, p. 2971-2976, 2007.

CULMAN, S.W.; GAUCH, H.G.; BLACKWOOD, C.B.; THIES, J.E. Analysis of T-RFLP data using analysis of variance and ordination methods: A comparative study. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 75, n. 1, p. 55-63, 2008

DEBOSZ, K.; RASMUSSEM, P.H.; PEDERSEN, A.R. Temporal variations in microbial biomass C and cellulolytic enzyme activity in arable soils: effects of organic matter input. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 13, n. 3, p. 209-218, 1999.

DEGENS, B.P.; SCHIPPER, L.A.; SPARLING, G.P.; VOJVODIC-VUKOVIC, M. Decreases in organic C reserves in soils can reduce the catabolic diversity of soil microbial communities. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 32, n. 2, p. 189-196, 2000.

DE NEVE, S; HOFMAN, G. Influence of soil compaction on carbon and nitrogen mineralization of soil organic matter and crop residues. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v. 30, n. 5/6, p. 544–549, 2000.

DICK, R.P.; MYROLD, D.D.; KERLE, E.A. Microbial biomass and soil enzyme activities in compacted and rehabilitated skid trail soils. **Soil Science Society of American Journal**, Madison, v. 52, n. 2, p. 512–516, 1988.

DINESH, R.; CHAUDHURI, S.G.; GANESHAMURTHY, A.N.; DEY, C. Changes in soil microbial indices and their relationships following deforestation and cultivation in wet tropical forests. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 24, p. 17-26, 2003.

EMBRAPA. Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos. **Manual de métodos de análise de solo**. Rio de Janeiro, 1997. 212 p.

EMBRAPA. Sistema brasileiro de classificação de solos. Rio de Janeiro, 2006. 306p.

FIERER, N.; NEMERGUT, D.; KNIGHT, R.; CRAINE, J.M. Changes through time: integrating microorganisms into the study of succession. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 161, n. 8, p. 635-642, 2010.

FRAZÃO, L.A.; PICCOLO, M.D. C.; FEIGL, B.J.; CERRI, C.C.; CERRI, C.E.P. Inorganic nitrogen, microbial biomass and microbial activity of a sandy Brazilian Cerrado soil under different land uses. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 135, n. 3, p. 161-167, 2010.

GRAHAM, M.H.; HAYNES, R.J. Organic matter status and the size, activity and metabolic diversity of the soil microflora as indicators of the success of rehabilitation of mined sand dunes. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v. 39, n. 6, p. 429–437, 2004.

GRIFFITHS, R.I.; WHITELEY, A.S.; O'DONNELL, A.G.; BAILEY, M.J. Physiological and community responses of established grassland bacterial populations to water stress. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 12, p. 6961-6968, 2003.

HEMMAT, A.; AGHILINATEGH, N.; REZAINEJAD, Y.; SADEGHI, M. Long-term impacts of municipal solid waste compost, sewage sludge and farmyard manure application on organic carbon, bulk density and consistency limits of a calcareous soil in central Iran. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 108, n. 1/2, p. 43-50, 2010.

INSAM, H.; HASELWANDTER, K. Metabolic quotient of the soil microflora in relation to plant succession. **Oecologia**, New York, v. 79, n. 2, p.174-178, 1989.

JOERGENSEN, R.G.; BROOKES, P.C. Ninhydrin-reactive nitrogen measurements of microbial biomass in 0.5 M K₂SO₄ soil extracts. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 22, n. 8, p. 1023-1027, 1990.

KASCHUK, G.; ALBERTON, O.; HUNGRIA, M. Three decades of soil microbial biomass studies in Brazilian ecosystems: Lessons learned about soil quality and indications for improving sustainability. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 42, n. 1, p. 1-13, 2010.

KEENEY, D.R.; NELSON, D.W. Nitrogen inorganic forms. In: PAGE A.L. **Methods of soil analysis**. Madison: American Society of Agronomy, 1982. pt. 2: Chemical and microbiological properties, p. 643-698.

KNOEPP, J.D.; COLEMAN, D.C.; CROSSLEY, D.A.; CLARK, J.S. Biological indices of soil quality: an ecosystem case study of their use. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 138, n. 1/3, p. 357-368, 2000.

LEININGER, S.; URICH, T.; SCHLOTTER, M.; SCHWARK, L.; QI, J.; NICOL, G.W.; PROSSER, J.I.; SCHUSTER, S.C.; SCHLEPER, C. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. **Nature**, London, v. 442, p. 806-809, 2006.

LI, C.H.; MA, B.L.; ZHANG, T.Q. Soil bulk density effects on soil microbial populations and enzyme activities during the growth of maize (*Zea mays* L.) planted in large pots under field exposure. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 82, n. 2, p. 147-154, 2002.

LONGO, R.M.; RIBEIRO, I.R.; de MELO, W.L. Recovery of degraded soils in the tin mineral exploitation: microbial biomass and dehydrogenase activity. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 1, p.132-138, 2011.

LYNCH, J.M.; BENEDETTI, A.; INSAM, H.; NUTI, M.P.; SMALLA, K.; TORSVIK, V.; NANNIPIERI, P. Microbial diversity in soil: ecological theories, the contribution of molecular techniques and the impact of transgenic plants and transgenic microorganisms. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v. 40, n. 6, p. 363-385, 2004.

MAKOI, J.H.J.R.; NDAKIDEMI, P.A. Selected soil enzymes: examples of their potential roles in the ecosystem. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 7, n. 3, p. 181-191, 2008

MARINARI, S.; MANCINELLI, R.; CARNPIGLIA, E.; GREGO, S. Chemical and biological indicators of soil quality in organic and conventional farming systems in Central Italy. **Ecological Indicators**, Amsterdam, v. 6, n. 4, p. 701-711, 2006.

MARSH, T.L. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 2, n. 3, p. 323-327, 1999.

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

NAHAS, E. Soil microorganisms phosphatase producers in different agricultural systems. **Bragantia**, Campinas, v. 61, n.3, p. 267-275, 2002.

NOGUEIRA, M.A.; ALBINO, U.B.; BRANDÃO-JUNIOR, O.; BRAUN, G.; CRUZ, M.F.; DIAS, B.A.; DUARTE, R.T.D.; GIOPOPO, N.M.R.; MENNA, P.; ORLANDI, J.M.; RAIMAM, M.P.; RAMPAZO, L.G.L.; SANTOS, M.A.; SILVA, M.E.Z.; VIEIRA, F.P.; TOREZAN, J.M.D.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, G. Promising indicators for assessment of agroecosystems alteration among natural, reforested and agricultural land use in southern Brazil. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 115, n. 1/4, p. 237-247, 2006.

OKUBO, A.; SUGIYAMA, S. Comparison of molecular fingerprinting methods for analysis of soil microbial community structure. **Ecological Research**, Tokyo, v. 24, n.6, p. 1399-1405, 2009.

PENGTHAMKEERATI, P.; MOTAVALLI, P.P.; KREMER, R.J. Soil microbial activity and functional diversity changed by compaction, poultry litter and cropping in a claypan soil. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 48, n. 1, p. 71-80, 2011.

PRADO, A.G.S.; AIROLDI, C. The influence of moisture on microbial activity of soils. **Thermochimica Acta**, Amsterdam, v. 332, n.1, p. 71-74, 1999.

QIN, S.P.; HU, C.S.; HE, X.H.; DONG, W.X.; CUI, J.F.; WANG, Y. Soil organic carbon, nutrients and relevant enzyme activities in particle-size fractions under conservational versus traditional agricultural management. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 45, n. 3, p. 152-159, 2010.

RAIJ, B. van; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agronômico, 2001. 285 p.

RETTEDAL, E.A.; CLAY, S.; BRÖZEL, V.S. GC-clamp primer batches yield 16S rRNA gene amplicon pools with variable GC clamps, affecting denaturing gradient gel electrophoresis profiles. **FEMS Microbiology Letters**, Malden, v. 312, p. 55-62, 2010.

RHEE, Y.H.; HAH, Y.C.; HONG, S.W.; Relative contributions of fungi and bacteria to carboxymethylcellulase activity. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v.19, p. 479-481, 1987.

SALAZAR, S.; SANCHEZ, L.E.; ALVAREZ, J.; VALVERDE, A.; GALINDO, P.; IGUAL, J.M.; PEIX, A.; SANTA-REGINA, I. Correlation among soil enzyme activities under different forest system management practices. **Ecological Engineering**, Amsterdam, v. 37, n. 8, p. 1123-1131, 2011.

SARATHCHANDRA, S.U.; GHANI, A.; YEATES, G.W.; BURCH, G.; COX, N.R. Effect of nitrogen and phosphate fertilisers on microbial and nematode diversity in pasture soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 33, n. 7/8, p. 953-964, 2001.

SAS INSTITUTE. SAS/STAT: user's guide statistics. Version 9.2. Cary: SAS Institute, 1999.

SCHINNER, F.; VONMERSI, W. Xylanase-activity, CM-cellulase-activity and invertase activity in soil: an improved method. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 22, n. 4, p. 511-515, 1990.

SCHOENHOLTZ, S.H.; Van MIEGROET, H.; BURGER, J.A. A review of chemical and physical properties as indicators of forest soil quality: challenges and opportunities. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 138, n. 1/3, p. 335-356, 2000.

SILVA, S.R.; SILVA, I.R.; BARROS, N.F.; MENDONÇA, E.S. Effect of compaction on microbial activity and carbon and nitrogen transformations in two oxisols with different mineralogy. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, n. 4, p. 1141-1149, 2011.

SIX, J.; BOSSUYT, H.; DEGRYZE, S.; DENEFF, K. A history of research on the link between (micro) aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 79, n. 1, p. 7-31, 2004.

TABATABAI, M.A.; BREMNER, J.M. Use of p-nitrofenol phosphate for assay of soil phosphatase activity. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 1, p. 301-307, 1969.

_____. Assay of urease activity in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 4, p. 479-487, 1972.

TAN, X.; CHANG, S.X.; KABZEMS, R. Soil compaction and forest floor removal reduced microbial biomass and enzyme activities in a boreal aspen forest soil. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v. 44, n. 3, p. 471-479, 2008.

TEJADA, M.; GARCIA, C.; GONZALEZ, J.L.; HERNANDEZ, M.T. Use of organic amendment as a strategy for saline soil remediation: influence on the physical, chemical and biological properties of soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 38, n. 6, p. 1413-1421, 2006.

TER BRAAK, C.J.F.; SMILAUER, P. **CANOCO Reference Manual and User's Guide to Canoco for Windows**: software for canonical community ordination (Version 4). New York: Microcomputer Power, 1988.

VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass-C. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 19, n. 6, p. 703-707, 1987.

WARDLE, D.A.; GHANI, A. A critique of the microbial metabolic quotient (qCO_2) as bioindicator of disturbance and ecosystem development. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 27, p. 1601-1610, 1995.

WILKINSON, S.C.; ANDERSON, J.M.; SCARDELIS, S.P.; TISIAFOULI, M.; TAYLOR, A.; WOLTERS, V. PLFA profiles of microbial communities in decomposing conifer litters subject to moisture stress. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 34, n. 2, p. 189-200, 2002.

_____. **World reference base for soil resources**. 2nd ed. Rome: FAO, 2006. 145 p. (World Soil Resource Reports, 103).

WRIGHT, S.F.; UPADHYAYA, A. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 198, n. 1, p. 97-107, 1998.

YAN, F.; McBRATNEY, A.B.; COPELAND, L. Functional substrate biodiversity of cultivated and uncultivated A horizons of vertisols in NW New South Wales. **Geoderma**, Amsterdam, v. 96, n. 4, p. 321-343, 2000.

3 FUNGOS MICORRÍZICOS E PROTEÍNAS DO SOLO RELACIONADAS COM A GLOMALINA EM DIFERENTES CONDIÇÕES EDÁFICAS E DE COBERTURA FLORESTAL

Resumo

Este estudo teve como objetivo levantar as espécies de FMA e avaliar GRSP (proteína do solo relacionada com glomalina) como indicador biológico da qualidade do solo em uma área de floresta não perturbada (NT) e três sites em diferentes estádios de recuperação: 20 anos (R20), 10 anos (R10), e 5 anos (R05), e com histórias diferentes de gerenciamento e texturas de solo. Buscou-se também determinar como os atributos químicos do solo, físicos e microbiológicos influenciam a distribuição de espécies de FMA e GRSP. Os gêneros *Glomus* e *Acaulospora* se relacionaram aos locais mais impactados. *G. rosea* foi mais relacionada com as áreas R10 e R20 que têm manejos, texturas e tempo de recuperação diferentes entre si. *G. geosporum* foi relacionado com as áreas NT e R10 sugerindo alguma influência da textura em sua distribuição. *S. pellucida* e outras espécies foram encontradas em apenas uma estação do ano, sugerindo a melhor época para coletar essas espécies. Correlações entre EE-GRSP e T-GRSP, por um lado, e de carbono total e nitrogênio além de desidrogenase e atividade da urease, MBC e MBN por outro atingiram de 40-70% e foram especialmente fortes no verão. A densidade do solo teve um efeito negativo e macroporosidade um efeito positivo sobre a EE-GRSP, sugerindo a necessidade de escolher entre EE-GRSP ou T-GRSP como indicador biológico, dependendo das características do solo e do manejo. Este estudo demonstra o efeito da idade de recuperação, da sazonalidade, e demais atributos do solo em AMF e distribuição de GRSP e a importância de se usar esses atributos biológicos como indicadores de qualidade do solo.

Palavras-chave: T-GRSP; EE-GRSP; Reagente de Bradford; Análise de componentes principais; Análise de redundância; Indicadores de qualidade ambiental

Abstract

This study had the objective of surveying AMF species and evaluating GRSP (glomalin related soil protein) as biological indicators of soil quality in an undisturbed forest site (NT) and three sites in different stages of recovery: 20 years (R20), 10 years (R10), and 5 years (R05), and different management histories and soil textures. How physical, chemical and microbiological soil attributes influence AMF species distribution and GRSP was also determine. *Glomus* and *Acaulospora* were related to more impacted sites. *G. rosea* was related to sites R10 and R20 that have different management histories, textures and also time of recovery. *G. geosporum* was related to sites NT and R10 suggesting some influence of texture on its distribution. *S. pellucida* and other species were found only in one season suggesting the best time to sample these species. Correlations between EE-GRSP and T-GRSP on one hand and total carbon and nitrogen besides dehydrogenase and urease activity, MBC, and MBN on the other reached values of 40-70% and were especially

strong in summer. Soil bulk density had a negative effect and macroporosity a positive effect only on EE-GRSP, indicating the necessity to choose either EE-GRSP or T-GRSP as biological indicator depending on the soil characteristics and management. This study demonstrates the effect of recovery age, seasonality, and other soil attributes on AMF and GRSP distribution and the importance to use these biological attributes as indicators of soil quality.

Keywords: T-GRSP; EE-GRSP; Bradford reagent; Principal component analysis; Redundance analysis; Biological indicator of soil quality

3.1 Introdução

Os fungos micorrizicos arbusculares (FMA) são importantes ferramentas para a recuperação de áreas degradadas. Esses fungos determinam a composição da comunidade vegetal (FRANCIS; READ, 1995; HEIJDEN et al., 1998) e contribuem para o aumento da taxa de crescimento das plantas devido à exploração de nutrientes e água pelas hifas (MARSCHNER, BAUMANN, 2003). São também responsáveis pelo aumento da tolerância das plantas a impactos ambientais como compactação, salinidade, metais pesados e seca (MIRANSARI, 2010). A partir da produção de glomalina, glicoproteína produzida pelos FMA, e pela estimulação da exsudação radicular em até 20 %, os FMA modulam a entrada de carbono no solo e estimulam a microbiota (BAI et al., 2009). Os FMA, a partir da ação das hifas e da glomalina, modificam também as características físicas do solo formando macroagregados mais estáveis, aumentando a resistência à erosão (RYAN; GRAHAM, 2002; RILLIG, 2004; BURRI; GROMKE; GRAF, 2011).

Alguns estudos envolvendo gradientes de recuperação vêm mostrando que a idade das áreas pode não ser tão importante quanto à diversidade vegetal para o aumento da diversidade de FMA (SOUZA et al., 2011). Contudo, alterações dos atributos físicos, químicos e biológicos do solo podem provocar mudança na estrutura de comunidade de FMA. A perda de carbono, a adubação (p. ex. fósforo), a redução de diversidade vegetal e também o manejo do solo podem causar a redução da diversidade de FMA (CUENCA; ANDRADE; ESCALANTE, 1998; CARPENTER et al., 2001; PEÑA-VENEGAS et al., 2007; SOUZA et al., 2011). Atributos físicos como textura, bem como a sazonalidade da umidade no solo também são fatores importantes que definem a distribuição das espécies de FMA (CUENCA; LOVERA, 2010).

Atributos físicos e químicos do solo podem se modificar com o tempo de recuperação, como, por exemplo, macroporosidade e teor de carbono (SIX et al., 2004; TEJADA et al., 2006). Fatores bióticos como biomassa microbiana, atividade microbiana e de enzimas do solo que, em conjunto com atributos físicos e químicos, são indicadores de qualidade, também costumam ser maiores em áreas nativas em estádios avançados de recuperação (MARINARI et al., 2006; CHODAK; PIETRZYKOWSKI; NIKLIŃSKA, 2009; CHODAK, NIKLIŃSKA, 2010).

A relação entre espécies de FMA e modificações dos atributos físicos, químicos e microbiológicos, em gradientes de recuperação, ainda precisa ser melhor compreendida (CARPENTER et al., 2001; PEÑA-VENEGAS et al., 2007; BAI et al., 2009; CUENCA; LOVERA, 2010; SOUZA et al., 2011). Compreender essa relação entre FMA e atributos do solo ajudará a determinar correlações entre espécies de FMA e esses atributos. Além disso, no Brasil, em geral, tem solos antigos que são ricos em Al e Fe que aumentam a adsorção de fósforo e reduzem sua disponibilidade para as plantas e para os microrganismos (GATIBONI et al., 2008). Consequentemente, os FMA desempenham um papel importante nos processos de recuperação florestal. Assim, compreender seu comportamento na recuperação florestal é fundamental para desenvolver novas práticas de gestão e tecnologias.

O conteúdo de glomalina do solo tem sido analisado de forma indireta por meio da análise de Bradford (WRIGHT; UPADHYAYA, 1998) e tem sido chamado de GRSP (proteínas do solo relacionadas com a glomalina), pois não possui somente glomalina em sua composição. Outros métodos, como imunensaio, têm sido utilizados para determinar a concentração da glomalina e reduzir a interferência de outras substâncias (WRIGHT; UPADHYAYA, 1998). A GRSP foi sugerida como indicador de qualidade do solo devido às diferenças encontradas entre florestas e pastagens e também pela relação com a agregação do solo, com o carbono e nitrogênio do solo, com a micorrização, com a exsudação radicular e também com a atividade enzimática (WU et al., 2012; FOKOM et al., 2012). Poucos estudos são relacionados com a influência do tempo de recuperação, manejo do solo e dos atributos do solo sobre a GRSP (RILLIG et al., 2003; BAI et al., 2010; FOKOM et al., 2012), especialmente no Brasil (SOUZA et al., 2011). Integrar o conteúdo de GRSP com os atributos do solo no processo de recuperação com áreas contrastantes quanto ao tempo de recuperação é importante para entender o comportamento

desse composto no processo de recuperação, sua relação com os atributos físicos, químicos e biológicos do solo e para o entendimento sobre a GRSP como indicador biológico do solo.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a utilização de espécies de FMA e da GRSP como indicadores de recuperação do solo e florestal.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Material e Métodos

3.2.1.1 Coleta de Amostras

Quatro áreas pertencentes ao Bioma Mata Atlântica e compostas por espécies de floresta Estacional Semidecídua (SOUZA; BATISTA, 2004) foram estudadas. As áreas escolhidas foram: *i*) uma área nativa - controle (NT) (22°49'42"S- 46°55'34"W), *ii*) e três áreas em recuperação há 20 anos (R20) (22°34'38.27"S- 47°30'27.62"W), há 10 anos (R10) (22°49'06"S- 47°24'52.89"W); e há 5 anos (R05) (22°42'02"S- 47°38'32"W). As duas áreas mais novas (R05 e R10) possuem um histórico recente de adubação e calagem, além de plantio de cana-de-açúcar.

Foram coletadas 15 amostras aleatoriamente entre 30 quadrantes (10x10m) demarcados nas áreas. O solo foi coletado no verão (Janeiro) e no inverno (Junho) (Figura 2.1) na profundidade de 0-20 cm, peneirado (2,00 mesh) e armazenado em câmara fria (4°C).

3.2.1.2 Análise dos Atributos Físicos e Químicos do Solo

Foram avaliadas a umidade, densidade, macroporosidade, microporosidade e frações silte, argila e areia segundo o protocolo descrito pela Embrapa (1997). A percentagem de umidade foi calculada pela diferença entre 10 g de solo fresco e o seco a 105 °C por 24 horas. Os quinze pontos por área foram unidos em três amostras compostas para análise da textura e somente foram utilizadas para confirmar as diferenças entre os tipos de solos das áreas. Como as áreas não foram modificadas ou manejadas ao longo do experimento, entre as propriedades físicas, somente a umidade do solo foi avaliada nas duas épocas de estudo.

A análise química do solo foi feita seguindo as metodologias descritas em Raij et al. (2001) sendo verificado: pH do solo em KCl e em H₂O, P disponível (resina), K⁺

(Mehlich 1), Al^{3+} (KCl), $\text{H}+\text{Al}$ (SMP), Ca^{+2} (resina), Mg^{2+} (resina), SB (soma de bases), CTC (capacidade de troca de cátions). Os teores de N-NH_4^+ e N-NO_3^- do solo foram avaliados por destilação utilizando solo úmido (KEENEY; NELSON, 1982). O carbono e nitrogênio totais do solo foram avaliados pelo método de combustão total utilizando o analisador elementar LECO-CN 2000. A análise de carbono e nitrogênio totais e também N-NH_4^+ e N-NO_3^- foram feitas nas duas épocas e as demais somente no verão para caracterizar o solo de cada área e não foram utilizadas nas análises. A caracterização física e química do solo se encontra nas tabelas 2.1 e 2.2.

3.2.1.3 Análise Microbiológica

O carbono da biomassa microbiana (CBM) e o nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) foram determinados pelo método de fumigação-extração (VANCE; BROOKES; JENKINSON, 1987) sendo que o NBM foi quantificado pelo método da ninhidrina (JOERGENSEN; BROOKES, 1990). Para os cálculos do CBM e NBM foram utilizados os coeficientes de conversão $k_c=0,4$ e $k_n=0,54$, respectivamente (KASCHUK; ALBERTON; HUNGRIA, 2010). A respiração basal do solo (C-CO_2) foi determinada utilizando 50 g de solo incubados por 20 dias a 28°C segundo Alef (1995). A partir dos resultados de CBM e da respiração basal, foi calculado o quociente metabólico ($q\text{CO}_2$), que representa a taxa de liberação de C-CO_2 por unidade de C na biomassa microbiana e por unidade de tempo. As enzimas analisadas foram desidrogenase (CASIDA; KLEIN; SANTORO, 1964), urease (EC 3.5.1.5.) (TABATABAI; BREMNER, 1972) e fosfatase ácida (TABATABAI; BREMNER, 1969). Todas as análises microbiológicas foram feitas nas duas épocas de coleta.

3.2.1.4 Extração e identificação de esporos de FMA no solo

Os esporos foram extraídos de uma amostra de 50g de solo segundo metodologia descrita por Gerdemann e Nicolson (1963) e centrifugados em água destilada, 3000 rpm (rotações por minuto) durante três minutos e, em solução aquosa de sacarose 70%, a 2000 rpm, por dois minutos; esta etapa foi realizada duas vezes. Os esporos foram contados sob microscópio estereoscópico com

aumento de 40 vezes, posteriormente foram separados em grupos morfológicamente semelhantes. Os grupos de esporos de FMA foram transferidos e montados em lâminas semi-permanentes, com resina de álcool polivinílico e glicerol (PVLG) e em reagente de Melzer.

A identificação foi feita em nível de espécie, quando possível, utilizando um microscópio óptico (100 a 400X), com o auxílio do manual de descrições de Schenck e Pérez (1990), fornecidas pela Coleção Internacional de fungos micorrízicos vesiculares e arbusculares (invam [http://. caf.wvu.edu](http://caf.wvu.edu)) e as descrições originais das espécies.

A extração de T-GRSP (glomalina total) e de EE-GRSP (glomalina facilmente extraível) produzidas pelos FMA foi feita segundo Wright; Upadhyaya (1998) e Rillig (2004) e, posteriormente, as concentrações foram avaliadas pelo método de Bradford utilizando *Bradford Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

3.2.1.5 Análise Estatística

A fim de verificar a relação entre as espécies e as áreas (NT, R20, R10 e R05) e devido à resposta linear da matriz das espécies (gradiente < 3) foi feita uma análise de componentes principais (ACP) no programa CANOCO versão 4.0 (TER BRAAK; SMILAUER, 1988) utilizando a média entre cada 3 pontos de coleta para gerar a matriz das espécies, totalizando 5 repetições por área.

A análise de redundância (RDA), utilizando o método de análise de coordenadas principais (PCoA), foi feita para verificar a relação entre as espécies e os atributos físicos e químicos (densidade, microporosidade, macroporosidade, umidade, carbono e nitrogênio total, N-NH₄, N-NO₃) e microbiológicos (qCO₂, respiração do solo, CBM, NBM e as atividades das enzimas fosfatase ácida, desidrogenase e urease). Nesta análise foram utilizados os 15 pontos amostrais devido à maior influência do número de amostras sobre a confiabilidade das relações. A partir dos dados de presença e ausência das espécies de FMA (n=15) foram calculadas as coordenadas utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard. No CANOCO, a matriz gerada nesse cálculo foi utilizada como matriz de espécies e as variáveis ambientais físico-químicas e microbiológicas como matriz de ambientais e as espécies como variáveis suplementares. O método de *forward*

selection ($p \leq 0,05$) foi utilizado para identificar as variáveis ambientais mais importantes para mostrar a associação com as espécies. qCO_2 , respiração basal e desidrogenase foram retiradas da análise devido ao efeito de multicolinearidade e o $N-NH_4$ devido à baixa significância. O teste de Monte Carlo ($p \leq 0,05$) foi aplicado para se determinar a significância das relações.

ANOVA e o teste de Tukey ($p \leq 0,05$) foram utilizados para verificar a importância da glomalina facilmente extraível (EE-GRSP) e da glomalina total (T-GRSP) para a separação das áreas. Para se determinar a relação entre a glomalina e as variáveis ambientais foi utilizada a correlação de *Pearson*. Essas análises foram realizadas utilizando o aplicativo SAS 9.2 (SAS Institute, 1999).

3.2.2 Resultados

3.2.2.1 Relação entre as áreas, as espécies de FMA e os atributos físicos, químicos e microbiológicos

No total foram encontradas 22 espécies de FMA provenientes de 456 esporos analisados. Na área NT foram encontradas 12 e 13 espécies, na área R20 foram encontradas 8 e 7 espécies, na área R10 5 e 7 e na R05 5 e 5, no verão e inverno respectivamente (Tabela 3.1). Para facilitar a interpretação, as espécies de *Glomus* e *Gigaspora* não-identificadas (Tabela 3.1) foram unidas em dois grupos distintos (*Glomus* e *Gigaspora*) nas análises de PCA e dbRDA.

Na PCA, a componente principal 1 (CP1) explicou 32,9 e 39,2 % e o eixo 2, 25,7 e 18,1 %, no verão e no inverno, respectivamente (Figura 3.1). As espécies de FMA foram relacionadas com as áreas e separadas principalmente entre as áreas NT e R05 (Figura 3.1). Destaca-se a maior presença das espécies *A. spinosa*, *A. colossica*, *A. lacunosa*, *G. decipiens* e *Gigaspora sp.*, na área NT e das espécies *G. viscosum*, *A. mellea*, *A. scrobiculata* e *S. heterogama* na área R05 e também da *G. rosea* nas áreas R10 e R20 (Figura 3.1). *S. pellucida* esteve presente na área R20, somente no inverno e as espécies de *Glomus* variaram entre as áreas NT e R05 dependendo da época (Figura 3.1; Tabela 3.1).

Tabela 3.1 – Números de esporos de FMA identificados (50 g de solo seco) na área Nativa (NT), e em gradiente de recuperação ambiental (R20, R10 e R05) (n=15). Tabela cedida por Bonfim (2011)

Espécies de FMA	Verão				Inverno			
	R05	R10	R20	NT	R05	R10	R20	NT
<i>Ambispora appendicula</i> (Spain, Sieverd. E Schenck) Spain, Oehl & Sieverd	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Acaulospora mellea</i> Spain & Schenck	15	4	6	3	24	2	5	5
<i>Ac. Foveata</i> Trappe & Janos,	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Ac. Colossica</i> Schultz, Bever & Morton	0	0	0	2	0	0	0	1
<i>Ac. Scrobiculata</i> Trappe	19	12	2	7	21	12	1	3
<i>Ac. Spinosa</i> Walker & Trappe	0	0	0	1	0	0	0	3
<i>Ac. Lacunosa</i> Morton	0	0	1	2	0	0	0	3
<i>Gigaspora decipiens</i> Hall & Abbott	0	0	1	2	0	0	1	1
<i>Gi. Rosea</i> Nicolson & Schenck,	0	0	1	0	0	2	1	0
<i>Gi. Albida</i> Schenck & Sm	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Gigaspora</i> sp1	0	0	0	2	0	0	0	0
<i>Gigaspora</i> sp2	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Glomus geosporum</i> (Nicolson & Gerd.) Walker	0	1	0	2	0	0	0	0
<i>Glomus viscosum</i> Nicolson	62	0	0	0	15	0	0	0
<i>Glomus</i> sp1	0	8	6	11	0	0	0	20
<i>Glomus</i> sp2	54	13	5	16	22	4	4	5
<i>Glomus</i> sp3	0	0	0	8	0	0	0	10
<i>Glomus</i> sp4	0	0	0	0	0	0	3	0
<i>Glomus</i> sp5	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>Racocetra intraornata</i> Goto, Maia & Oehl	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>Scutellospora heterogama</i> (Nicolson e Gerd.) Walker & Sanders	4	0	1	1	1	2	0	0
<i>S. pellucida</i> (Nicol. & Schenck) Walker e Sanders	0	0	0	0	0	0	2	0
Total de esporos	154	38	23	57	83	28	17	56
Número de espécies	5	5	8	12	5	7	7	13

Figura 3.1 – Representação gráfica da análise de componentes principais das espécies de FMA em relação às quatro áreas (nativa, R20, R10 e R05) avaliadas no verão (A) e no inverno (B). (A) CP1 (32,9 %) e CP2 (26,3 %); (B) CP1 (39,2%) e CP2(18,1). (n=5). *Glomus* (soma das espécies não identificadas *Glomus* sp1, *G. sp2*, *G. sp3*, *G. sp4* e *G. sp5*). *Gigaspora* (soma das espécies *Gigaspora* sp1 e *G. sp2*)

De acordo com os testes multivariados de Wilks Lambda, Pillai Trace, Hotelling-Lawley e Roy houve efeito multivariado entre as espécies de FMA e os atributos físicos, químicos e microbiológicos estudados para as duas épocas ($p < 0.01$).

Na análise de dbRDA observou-se a relação entre os atributos físicos, químicos e microbiológicos com a distribuição de espécies de FMA de acordo com o teste de Monte Carlo ($p < 0.002$) (TER BRAAK; SMILAUER, 1988) para as duas épocas de coleta. No verão, o eixo 1 e 2 explicaram 39,7 e 20,9 % respectivamente, considerando a soma da explicação das variáveis ambientais e das espécies. De acordo com essa mesma análise, ainda foi observada correlação entre as espécies (presença e ausência) e os atributos físico-químicos e microbiológicos de 84,1 % no eixo 1 e de 59,7 % no CP 2 (Figura 3.2 A). No inverno, os eixos 1 e 2 explicaram 33,3 % e 30,7 %, respectivamente e ocorreu correlação entre as espécies e os atributos físicos químicos e microbiológicos de 86,6 % no eixo 1 e de 83,7 %, no eixo 2.

A distribuição das variáveis ambientais está relacionada com a distribuição das espécies a partir da matriz gerada utilizando o coeficiente de similaridade (*Jaccard*). De acordo com o teste de Monte Carlo ($p < 0.002$) houve associação entre as variáveis ambientais e as espécies de FMA. A partir do *forward selection* ($p < 0,05$), as principais variáveis ambientais que explicaram a relação com as espécies de FMA, no verão, foram N-NO₃, microporosidade, atividade da fosfatase ácida e densidade. No inverno, destacaram-se as variáveis microporosidade, macroporosidade, densidade, umidade, CBM e NBM (Figura 3.2 A e B).

No verão, observou-se uma influência da idade de recuperação no CP1 (figura 3.2 A) em relação às variáveis ambientais e às espécies de FMA. Associação entre as espécies *G. decipiens*, *A. lacunosa* e *Gigaspora* com a atividade da fosfatase ácida e entre *A. colossica*, *G. geosporum*, *G. decipiens* com N-NO₃⁻ foi encontrada. *A. scrobiculata*, *A. mellea* e *G. viscosum* foram as espécies que mais se associaram com a microporosidade e com a densidade. *G. rosea*, encontrada principalmente nas áreas R10 e R20 nas duas épocas, sofreu pouca influência das variáveis ambientais (Figura 3.2).

No inverno, o eixo 2 foi mais importante para separar a área NT da R05 (Figura 3.2 B). *A. scrobiculata*, *A. mellea* e *G. viscosum* foram as únicas espécies associadas positivamente com a densidade, microporosidade e umidade (Figura

3.2B), lembrando que são espécies mais concentradas na área R05 (Figura 3.1). *R. intraornata* e *S. pellucida* foram as espécies mais ligadas com o carbono da biomassa e *G. decipiens* e *A. spinosa* com a macroporosidade. Além disso, apesar de ser menos importante para a discriminação das áreas, observou-se influência do NBM sobre a *A. appendicula*, *A. colossica* e *A. lacunosa*.

Figura 3.2 - Representação gráfica da análise de redundância (RDA) utilizando o método de análise de coordenadas principais (PCoA) para a distribuição das espécies de FMA. Densidade (dens), microporosidade (microp), macroporosidade (macrop), umidade (umid), carbono da biomassa microbiana (CBM), nitrogênio da biomassa microbiana (NBM), carbono total do solo (Carb T), nitrogênio total do solo (NIT), N na forma de nitrato (N-NO_3), atividade da urease (Urease) e atividade da fosfatase ácida (FAc) foram usadas como variáveis explicativas nas duas épocas de coleta verão (A) e inverno (B). (A) Eixo 1 (39,7) e Eixo 2 (20,9 %). (B) Eixo 1 (33,3 %) e Eixo 2 (30,7 %). (n=15). Glomus (soma das espécies não identificadas *Glomus* sp1, *G. sp2*, *G. sp3*, *G. sp4* e *G. sp5*. Gigaspora (soma das espécies *Gigaspora* sp1 e *Gi. sp2*)

3.2.2.2 Influência dos atributos físicos, químicos e microbiológicos sobre a EE-GRSP e T-GRSP

Somente EE-GRSP separou a área NT das demais (Tukey $p \leq 0,05$) (Figura 3.3). Maiores valores de glomalina foram encontradas no inverno tanto para EE-GRSP (para R05, R10 e NT, Tukey $p \leq 0,05$) quanto para T-GRSP (para R05 e R10, Tukey $p \leq 0,05$) (Figura 3.3).

Ocorreram correlações entre EE-GRSP e T-GRSP com os atributos químicos (carbono e nitrogênio totais do solo e N-NO_3^-) e microbiológicos (CBM, NBM, fosfatase ácida, desidrogenase e urease) dependendo da glomalina extraída e da época de coleta (Tabela 3.2). Destaca-se também o efeito negativo da densidade, no verão e positivo da macroporosidade nas duas épocas para a EE-GRSP (Tabela 3.2).

Figura 3.3 - Média dos valores EE-GRSP (A) e T-GRSP (B) entre as quatro áreas (NT, R20, R10 e R05), nas duas épocas de coleta e desvio padrão da média, n=15. Barras seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de *Tukey* ($p \leq 0,05$). * representa a diferença entre época ($p \leq 0,05$) na mesma área

Tabela 3.2 - Coeficiente de correlação entre glomalina (EE-GRSP e T-GRSP) e os atributos microbiológicos nas duas épocas de coleta (verão/inverno) (n=15)

Variáveis	EE-GRSP		T-GRSP	
	Verão	Inverno	Verão	Inverno
Carbono Total %	0,72 ^{***}	0,69 ^{***}	0,61 ^{***}	0,38 [*]
Nitrogênio Total %	0,70 ^{***}	0,71 ^{***}	0,53 ^{***}	0,33 [*]
N-NH₄	0,27 ^{ns}	0,32 ^{ns}	0,24 ^{ns}	0,24 ^{ns}
N-NO₃	0,52 ^{***}	0,14 ^{ns}	0,36 [*]	-0,06 ^{ns}
Densidade	-0,41 ^{**}	-0,13 ^{ns}	-0,21 ^{ns}	0,06 ^{ns}
Microporosidade	-0,19 ^{ns}	-0,18 ^{ns}	-0,15 ^{ns}	0,03 ^{ns}
Macroporosidade	0,47 ^{***}	0,43 ^{**}	0,30 ^{ns}	0,11 ^{ns}
Umidade	-0,11 ^{ns}	-0,03 ^{ns}	-0,10 ^{ns}	0,04 ^{ns}
CBM	0,48 ^{***}	0,43 ^{**}	0,42 ^{**}	0,22 ^{ns}
NBM	0,57 ^{***}	0,62 ^{***}	0,41 ^{**}	0,40 ^{**}
Fosfatase Ácida	0,42 ^{**}	0,38 [*]	0,36 [*]	0,064 ^{ns}
Urease	0,55 ^{***}	0,29 ^{ns}	0,43 ^{**}	0,11 ^{ns}
Desidrogenase	0,66 ^{***}	0,44 ^{**}	0,63 ^{***}	0,16 ^{ns}

* p<0,01 **p<0,001 ***p<0,0001 ns = não significativo

3.2.3 Discussão

Nossos resultados mostraram que os FMA e a GRSP são importantes indicadores do solo em conjunto com os atributos físicos, químicos e biológicos do solo. As espécies mais relacionadas a área R05 foram *G. viscosum*, *A. mellea*, *A. scrobiculata* e *S. heterogama*. Essas espécies provavelmente estejam mais adaptadas à compactação do solo representada pela microporosidade e densidade do solo dessa área. Klauberg-Filho; Siqueira; Moreira (2002) verificaram que em regiões contaminadas com metais pesados prevalecem espécies dos gêneros *Glomus* (p.ex. *Glomus clarum*), *Acaulospora* (p. ex. *Acaulospora mellea*) e também *Scutellospora* (p. ex. *Scutellospora pellucida*), o que indica maior resistência desses gêneros a ambientes impactados. Os gêneros *Glomus* e *Acaulospora* foram os que predominaram entre as áreas e são conhecidos por serem amplamente distribuídos e mais abundantes em comparação com outros gêneros tanto em áreas nativas quanto em recuperação em solos tropicais (CUENCA; ANDRADE; ESCALANTE, 1998; PEÑA-VENEGAS et al., 2007; TIAN et al., 2009). O maior número de esporos encontrados na área R05 (Tabela 3.1) pode ser devido à maior presença de gramíneas as quais possuem maior densidade de raízes. Além disso, o plantio e

replântio recente de cana-de-açúcar podem ter estimulado a esporulação e determinado as espécies encontradas nessa área.

As espécies típicas da área NT foram *R. intraornata*, *G. geosporum*, *A. appendicula* e *A. spinosa* (Figura 3.1). *R. intraornata* foi recentemente descrita (GOTO et al., 2009) e ainda existe pouca informação a respeito do comportamento dessa espécie em diferentes ambientes. Essa espécie se relacionou com atributos do solo como CBM e atividade da urease (Figura 3.2), importantes indicadores de qualidade do solo, somente no inverno (MARINARI et al., 2006; PENGTHAMKEERATI et al., 2011) o que sugere que *R. intraornata* é sensível à degradação do solo ou a sazonalidade. Do mesmo modo, a espécie *Ambispora appendicula* foi reportada somente na área NT, no inverno (Figura 3.1). Essa espécie foi reportada por Souza et al. (2011) em diferentes estádios de recuperação e somente na estação seca em áreas naturais, conforme visto neste estudo e teve relação com o carbono e nitrogênio do solo e também com o N-NO₃, indicando interação com o ciclo de nutrientes (VERESOGLOU; CHEN; RILLIG, 2012) e também com a atividade microbiana.

A espécie *G. geosporum* foi encontrada tanto em florestas primárias quanto secundárias e também em pastagens (GAVITO et al., 2008). Apesar da maior relação com a área NT pela PCA (Figura 3.1 A), *G. geosporum* foi também encontrado na área R10 (Tabela 3.1). Duas espécies de *Gigaspora* foram encontradas somente na área NT (Tabela 3.1). Espécies desse gênero têm sido destacadas como mais sensíveis ao distúrbio sendo encontradas principalmente em ambientes naturais (CUENCA; ANDRADE; ESCALANTE, 1998). Destaca-se também a presença de *G. rosea* somente nas áreas intermediárias no processo de recuperação e a presença de *S. pellucida* na área R20, no inverno. Essa espécie foi reportada por Allen et al. (1998) tanto em ambientes de pastagens quanto em matas ao estudar diversidade de fungos micorrízicos e a influência da sazonalidade em Florestas Tropicais Decíduas. Outros trabalhos também têm mostrado o efeito da sazonalidade sobre a distribuição de espécies e propágulos (CUENCA; LOVERA 2010; SOUZA et al., 2011).

Maior número de espécies foi encontrado na área NT e na área R20 (Tabela 3.1). Os impactos ambientais causados pela degradação do solo, como perda da matéria orgânica, acompanhada da perda de diversidade vegetal podem afetar negativamente a diversidade de FMA (CUENCA; ANDRADE; ESCALANTE, 1998;

TIAN et al., 2009; SOUZA et al., 2011). Ambientes cujos solos são compactados apresentam efeito negativo sobre a microbiota devido à menor aeração e disponibilidade de nutrientes (DE NEVE; HOFMAN, 2000; LI; MA; ZHANG, 2002; HEMMAT et al., 2010; PENGTHAMKEERATI; MOTAVALLI; KREMER, 2011). Ambientes mais antigos no processo de recuperação geralmente possuem menor densidade, maior macroporosidade e acúmulo de carbono devido à maior atividade das raízes (TEJADA et al., 2006; SIX et al., 2004), o que pode influenciar na diversidade e na colonização dos FMA.

A umidade também é um fator que determina a taxa de colonização, sendo necessário um balanço ideal de umidade para garantir a atividade vegetal e micorrização (GAVITO et al., 2008). É importante frisar que a textura é semelhante entre as áreas NT e R10 e entre as áreas R20 e R05 (Tabela 2.1). Essas duas últimas áreas são mais argilosas, o que explica maior microporosidade. Porém, a densidade e a macroporosidade seguem o gradiente de recuperação das áreas, sendo fatores importantes para a distribuição das espécies de FMA (Tabela 2.1). Desse modo, devido ao efeito da textura e da microporosidade sobre a retenção de água, a umidade foi um fator importante para separar as áreas no inverno em relação às espécies de FMA. A umidade, devido às chuvas no verão, influenciou menos as áreas R20 e R05 e permitiu melhor separação em relação à área NT, formando um gradiente de recuperação, principalmente no eixo 1 (Figura 3.2 A). A textura também é um fator que pode ser determinante para a sobrevivência de algumas espécies como sugerido por Cuenca e Lovera (2010) para espécies do gênero *Scutellospora*. Esses autores também discutem a necessidade de escolher a melhor época do ano para se coletar esporos de FMA, devido ao efeito da sazonalidade.

O N-NO₃ e a atividade da fosfatase ácida foram fatores que apresentaram associação com as espécies de FMA, no verão (Figura 3.2 A). As espécies mais relacionadas positivamente a esses fatores são encontradas principalmente na área NT em que se observa maiores valores de N-NO₃, carbono total e atividade microbiana. (Figura 3.2). No inverno, a biomassa microbiana foi o principal fator microbiológico a se associar com os FMA da área NT. Os FMA são vistos como estimuladores da atividade microbiana, principalmente ao aumentar o teor de carbono no solo (MIRANSARI, 2010) e, provavelmente, algumas espécies podem

exercer maior influência sobre a biomassa microbiana e sobre a atividade enzimática. Isso indica também que os FMA formam importante parte da biomassa microbiana na estação seca, em que pode ocorrer redução da mobilidade de fósforo e da disponibilidade de água para as plantas. Desse modo, a eficiência da recuperação ambiental pode ser melhorada com melhores conhecimentos sobre a influência dos atributos físicos, químicos e biológicos sobre os FMA.

A concentração de GRSP encontrada nesse trabalho foi entre 1,3 a 2,3 mg g⁻¹ de solo o que está de acordo com outros trabalhos (FOKOM et al., 2012). A maior concentração de GRSP, tanto T-GRSP quanto EE-GRSP, foi encontrada no inverno. A maior concentração de GRSP no inverno pode ser devido a alguns fatores como: I - resultado do acúmulo ao longo dos seis meses anteriores (BUYER et al., 2011) e II- devido à maior atividade microbiana no verão (maior temperatura e umidade) e maior decomposição da glomalina mais acessível. Contudo, essa última hipótese indicaria uma relação negativa entre GRSP e os indicadores de atividade microbiana como biomassa e enzimas (Tabela 3.2). Outras enzimas devem ser analisadas para encontrar essa relação negativa, conforme visto por Wu et al. (2012) entre GRSP e a atividade da protease.

A GRSP é composta principalmente por carbono e nitrogênio e foi altamente correlacionada com o carbono e nitrogênio total do solo (Tabela 3.2), como observado em outros estudos (BAI et al., 2009; FOKOM et al., 2012), sendo, parte importante da matéria orgânica do solo. A correlação entre GRSP e N-NO₃, no verão, reforça essas observações, integrando a GRSP com a atividade microbiana e com a ciclagem de nutrientes (WU et al., 2012). Além disso, a relação entre GRSP com a biomassa microbiana, atividade da desidrogenase, da fosfatase e da urease reforça a importância da GRSP para a ciclagem de nutrientes e para a recuperação ambiental.

Para a T-GRSP observa-se uma ligeira vantagem da área R05 em relação às áreas intermediárias e a ausência de diferença em relação à área NT. A T-GRSP geralmente se encontra complexada à argila o que a torna mais recalcitrante e bastante persistente quando comparada à EE-GRSP (WRIGHT; UPADHAYA, 1998). Em certas circunstâncias (p. ex. não revolvimento do solo e baixa exposição do solo às intempéries), a T-GRSP pode não variar com a idade das áreas em recuperação (SOUZA et al., 2011). Além disso, áreas com maior produtividade primária e com maior abundância de raízes, como as gramíneas, podem possuir maior

concentração de glomalina (TRESEDER; TURNER, 2007), ou ainda por possuírem menor tempo de recuperação, ainda deve existir uma concentração residual da T-GRSP de época anterior ao plantio florestal. Isso pode explicar a ligeira vantagem da área R05 em relação às intermediárias. Outra explicação possível é uma maior produção de GRSP devido ao efeito da compactação nas áreas mais novas (Figura 3.3), considerando somente as áreas em recuperação.

A ausência dessa relação entre compactação e EE-GRSP, sugere sua maior interação com os microrganismos do solo e com uma maior sensibilidade ao processo de recuperação que pelas condições físicas do solo (p. ex. compactação), o que pode ser observado pelo maior número de correlações e pela ausência de significância para separar as áreas (Tabela 3.2 e Figura 3.3). Destaca-se a relação positiva com a EE-GRSP com a macroporosidade e a relação negativa entre EE-GRSP e a densidade do solo. A macroporosidade é um atributo físico importante para o estímulo da microbiota do solo, pois está relacionada positivamente com o carbono do solo, com a densidade de raízes e também com a estabilidade de agregados e negativamente com a densidade e com a compactação do solo (SIX et al., 2004).

3.3 Conclusões

- Os FMA variaram com as áreas em diferentes estádios de recuperação e apresentaram correlação com atributos físicos, químicos e microbiológicos do solo.

- *G. viscosum*, *A. mellea*, *A. scrobiculata* e *S. heterogama* foram encontrados na área mais nova do estádio de recuperação sendo relacionados a áreas mais impactadas.

- *G. rosea* foi encontrada somente nas áreas intermediárias (R10 e R20).

- *R. intraornata*, *A. appendicula* e *A. spinosa* se mostraram mais sensíveis aos impactos ambientais e a sazonalidade, sendo encontradas somente na área nativa.

- A GRSP variou com a época de coleta e apresentou correlação com os atributos microbiológicos e químicos do solo importantes para a ciclagem de nutrientes.

- a EE-GRSP se mostrou mais relacionada aos atributos microbiológicos do solo que a T-GRSP.

Referências

- ALEF, K. Soil respiration. In: ALEF, K.; NANNPIERI, P. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. Amsterdam: Academic Press, 1995. p. 234-245.
- ALLEN, E.B.; RINCÓN, E.; ALLEN, M.F.; PÉREZ-JIMENEZ, A.; HUANTE, P. Disturbance and seasonal dynamics of mycorrhizae in a tropical deciduous forest in Mexico. **Biotropica**, Lawrence v. 30, n. 2, p. 261-274, 1998.
- BAI, C.; HE, X.; TANG, H.; SHAN, B.; ZHAO, L. Spatial distribution of arbuscular mycorrhizal fungi, glomalin and soil enzymes under the canopy of *Astragalus adsurgens* Pall. in the Mu Us sandland, China. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 41, p. 941-947, 2009.
- BASTIDA, F.; MORENO, J. L.; HERNÁNDEZ, T.; GARCÍA, C. Microbiological activity in a soil 15 years after its devegetation. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 38, n. 8, p. 2503-2507, 2006.
- BONFIM, J.A. **Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares em áreas restauradas de Mata Atlântica, São Paulo, Brasil**. 2011. 92 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11140/tde-29062011-085842/es.php>. Acesso em: 04 nov. 2011.
- BURRI, K.; GROMKE, C.; GRAF, F. Mycorrhizal fungi protect the soil from erosion: a wind tunnel study. **Land Degradation and Development**, West Sussex, 2011. In press.
- BUYER, J.S.; ZUBERER, D.A.; NICHOLS, K.A.; FRANZLUEBBERS, A.J. Soil microbial community function, structure, and glomalin in response to tall fescue endophyte infection. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 339, n. 1/2, p. 401-412, 2011.
- CARPENTER, F.L.; MAYORGA, S.P.; QUINTERO, E.G.; SCHROEDER, M. Land-use and erosion of a Costa Rican Ultisol affect soil chemistry, mycorrhizal fungi and early regeneration. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 144, n. 1/3, p. 1-17, 2001.
- CASIDA, L.E.; KLEIN, D.A.; SANTORO, T. Soil dehydrogenase activity. **Soil Science**, Philadelphia, v. 98, p. 371-376, 1964.
- CHODAK, M.; NIKLIŃSKA, M. Effect of texture and tree species on microbial properties of mine soils. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 46, n. 2, p. 268-275, 2010.
- CHODAK, M.; PIETRZYKOWSKI, M.; NIKLIŃSKA, M. Development of microbial properties in a chronosequence of sandy mine soils. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 41, n. 3, p. 259-268, 2009.

CUENCA, G.; LOVERA, M. Seasonal variation and distribution at different soil depths of arbuscular mycorrhizal fungi spores in a tropical sclerophyllous shrubland. **Botany**, Ottawa, v. 88, p. 54-64, 2010.

CUENCA, G.; DE ANDRADE, Z.; ESCALANTE, G. Diversity of Glomalean spores from natural, disturbed and revegetated communities growing on nutrient-poor tropical soils. **Soil Biology and Soil Biochemistry**, Kidlington, v. 30, n. 6, p. 711–719, 1998.

DE NEVE, S; HOFMAN, G. Influence of soil compaction on carbon and nitrogen mineralization of soil organic matter and crop residues. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v. 30, n. 5/6, p. 544–549, 2000.

EMBRAPA. Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos. **Manual de métodos de análise de solo**. Rio de Janeiro, 1997. 212 p.

FOKOM, R.; ADAMOU, S.; TEUGWA, M.C.; BEGOUDE BOYOGUENO, A.D.; NANA, W.L.; NGONKEU, M.E.L.; TCHAMENI, N.S.; NWAGA, D.; TSALA NDZOMO, G.; AMVAM ZOLLO, P.H. Glomalin related soil protein, carbon, nitrogen and soil aggregate stability as affected by land use variation in the humid forest zone of south Cameroon. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 120, p. 69-75, 2012.

FRANCIS, R.; READ, D.J. Mutualism and antagonism in the mycorrhizal symbiosis, with special reference to impacts on plant community structure. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, p. S1301-S1309, 1995.

GAVITO, M.E.; PÉREZ-CASTILLO, D.; GONZÁLES-MONTEERRUBIO, C.F.; VIEYRA-HERNÁNDEZ, T.; MARTÍNEZ-TRUJILLO, M. High compatibility between arbuscular mycorrhizal fungal communities and seedlings of different land use types in a tropical dry ecosystem. **Mycorrhiza**, New York, v. 19, n. 1, p. 47-60, 2008.

GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v.46, p.235-244, 1963.

GOTO, B.T.; MAIA, L.C.; SILVA, G.A. da; OEHL, F. *Racocetra intraornata*, a new species in the Glomeromycetes with a unique spore wall structure. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 109, p. 483-491, 2009.

HEIJDEN, M.G.A. van der; KLIRONOMOS, J.N.; URSIC, M.; MOUTOGLIS, P.; STREITWOLF-ENGEL, R.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A.; SANDERS, I.R. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. **Nature**, London, v. 396, n. 6706, p. 69-72, 1998.

HEMMAT, A.; AGHILINATEGH, N.; REZAINEJAD, Y.; SADEGHI, M. Long-term impacts of municipal solid waste compost, sewage sludge and farmyard manure application on organic carbon, bulk density and consistency limits of a calcareous soil in central Iran. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 108, n. 1/2, p.43-50, 2010.

JOERGENSEN, R.G.; BROOKES, P.C. Ninhydrin-reactive nitrogen measurements of microbial biomass in 0.5 M K₂SO₄ soil extracts. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 22, n. 8, p.1023-1027, 1990.

KASCHUK, G.; ALBERTON, O.; HUNGRIA, M. Three decades of soil microbial biomass studies in Brazilian ecosystems: Lessons learned about soil quality and indications for improving sustainability. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 42, n. 1, p.1-13, 2010.

KEENEY, D.R.; NELSON, D.W. Nitrogen inorganic forms. In: PAGE A.L. **Methods of soil analysis**. Madison: American Society of Agronomy, 1982. pt. 2: Chemical and microbiological properties. p. 643-698.

KLAUBERG-FILHO, O.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. Fungos micorrízicos arbusculares em solos de área poluída com metais pesados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 25, p. 125-134, 2002.

LI, C.H.; MA, B.L.; ZHANG, T.Q. Soil bulk density effects on soil microbial populations and enzyme activities during the growth of maize (*Zea mays* L.) planted in large pots under field exposure. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 82, n. 2, p. 147-154, 2002.

MARINARI, S.; MANCINELLI, R.; CARNPIGLIA, E.; GREGO, S. Chemical and biological indicators of soil quality in organic and conventional farming systems in Central Italy. **Ecological Indicators**, Amsterdam, v. 6, n. 4, p.701-711, 2006.

MARSCHNER, P.; BAUMANN, K. Changes in bacterial community structure induced by mycorrhizal colonisation in split-root maize. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 251, n. 2, p. 279-289, 2003.

MIRANSARI, M. Contribution of arbuscular mycorrhizal symbiosis to plant growth under different types of soil stress. **Plant Biology**, Malden, v. 12, n. 4, p. 563-569, 2010.

PEÑA-VENEGAS, C.P.; CARDONA, G.I.; ARGUELLES, J.H.; ARCOS, A.L. Micorrizas arbusculares del Sur de la Amazonia Colombiana y su relación con algunos factores fisicoquímicos y biológicos del Suelo. **Acta Amazônia**, Manaus, v. 37, p. 327-336, 2007.

PENGTHAMKEERATI, P.; MOTAVALLI, P.P.; KREMER, R.J. Soil microbial activity and functional diversity changed by compaction, poultry litter and cropping in a claypan soil. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 48, n.1, p. 71-80, 2011.

RAIJ, B. van; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2001. 285 p.

RILLIG, M.C. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v. 28, p. 355-363, 2004.

RILLIG, M.C.; RAMSEY, P.W.; MORRIS, S.; PAUL, E.A. Glomalin , an arbuscular-mycorrhizal fungal soil protein , responds to land-use change. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 253, n. 2, p. 293-299, 2003.

RYAN, M.H.; GRAHAM, J.H. Is there a role for arbuscular mycorrhizal fungi in production agriculture? **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 244, n. 1/2, p. 263-271, 2002.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT**: user's guide statistics; version 9.2. Cary, 1999.

SCHENCK, N.C.; PÉREZ, Y. **Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi**. 3rd ed. Gainesville: Synergistic, 1990. 250 p.

SIX, J.; BOSSUYT, H.; DEGRYZE, S.; DENEFF, K. A history of research on the link between (micro) aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 79, n. 1, p. 7-31, 2004.

SOUZA, F.M.; BATISTA, J.L.F. Restoration of seasonal semideciduous forest in Brasil: influence of age and restoration design on forest structure. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 191, n. 1/3, p. 185-200, 2004.

SOUZA, R.G. de; SILVA, D.K.A. da; MELLO, C.M.A. de; GOTO, B.T.; SILVA, F.S.B. da; SAMPAIO, E.V.S.B.; MAIA, L.C. Arbuscular mycorrhizal fungi in revegetated mined dunes. **Land Degradation and Development**, West Sussex, 2011. In press.

TABATABAI, M.A.; BREMNER, J.M. Use of p-nitrofenol phosphate for assay of soil phosphatase activity. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 1, p. 301-307, 1969.

_____. Assay of urease activity in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 4, p. 479-487, 1972.

TEJADA, M.; GARCIA, C.; GONZALEZ, J.L.; HERNANDEZ, M.T. Use of organic amendment as a strategy for saline soil remediation: influence on the physical, chemical and biological properties of soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 38, n. 6, p. 1413-1421, 2006.

TER BRAAK, C.J.F.; SMILAUER, P. **CANOCO reference manual and user's guide to Canoco for windows**: software for canonical community ordination (Version 4). New York: Microcomputer Power, 1988.

TIAN, H.; GAI, J.P.; ZHANG, J.L.; CHRISTIE, P.; LI, X.L. Arbuscular mycorrhizal fungi in degraded typical steppe of Inner Mongolia. **Land Degradation and Development**, West Sussex, v. 20, p. 41-54, 2009.

TRESEDER, K.K.; TURNER, K.M. Glomalin in ecosystems. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 71, n. 4, p. 1257-1266, 2007.

VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass-C. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 19, n. 6, p. 703-707, 1987.

VERESOGLOU, S.D.; CHEN, R.; RILLIG, M.C. Arbuscular mycorrhiza and soil nitrogen cycling. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 46, p. 53-62, 2012.

WRIGHT, S.F.; UPADHYAYA, A. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 198, n. 1, p. 97-107, 1998.

4 MACROFAUNA DO SOLO EM DIFERENTES CONDIÇÕES EDÁFICAS E DE COBERTURA FLORESTAL

Resumo

As matas ciliares vêm sofrendo grandes reduções no Brasil, sendo muito poucos os estudos voltados aos indicadores de qualidade de solo nesses ambientes. Objetivou-se com esse trabalho encontrar relação entre a fauna edáfica e atributos físicos, químicos e microbiológicos do solo e encontrar os indicadores que mais contribuem para discriminar as quatro áreas: [Nativa (NT) e em Recuperação com 20 (R20), 10 (R10) e 5 (R05) anos] em estádios sucessionais pertencentes à Floresta Estacional Semidecídua, em duas épocas contrastantes (chuvosa e seca). Foram calculados a riqueza e os índices de diversidade [Shannon (H), Simpson (Is) e Pielou(e)]. Em cada área foi definida uma grade de amostragem com 30 pontos de 10 x 10 m cada, sendo escolhidos aleatoriamente 15 pontos para serem analisados, separadamente. A fauna edáfica foi avaliada por meio de duas metodologias: armadilhas e monólitos de 20 x 20 cm de lado na profundidade de 0-20 cm. Os grupos da macrofauna identificados foram avaliados pela análise canônica discriminante (ACD) e comparados com atributos físico-químicos e microbiológicos utilizando-se a análise de redundância canônica (RDA). Houve separação significativa entre as áreas, considerando os métodos e épocas de coleta pela ACD. O nitrogênio total do solo, a porosidade, a densidade e umidade e os atributos biológicos desidrogenase e urease foram os mais importantes para a separação do gradiente de recuperação de Mata Ciliar. Houve diferença na riqueza de espécies quanto ao método de coleta utilizado. A maior riqueza foi encontrada pelo método de monólitos. Diplopoda, Araneae, Pseudoscorpionida, Opiliones e Isoptera ficaram mais relacionados com as áreas mais antigas e Hymenoptera, com as áreas mais novas. A composição física, química e biológica do solo sofreu mudanças com o tempo e com o clima e influenciou a diversidade da fauna edáfica.

Palavras-chave: Análise discriminante canônica; Análise de redundância canônica; Fauna edáfica; Bioma Mata Atlântica; Atributos físicos, químicos e microbiológicos

Abstract

Large expanses of forest vegetation have been destroyed in Brazil, where few studies have focused on indicators of soil quality in riparian environments. The objective of this study was to assess relationships between the soil fauna and physical, chemical, and microbiological soil attributes and to identify the indicators that most effectively distinguish between four study sites along a gradient of recovery in Brazil's Seasonal Semideciduous Forest: one undisturbed site, and three that have been recovering from disturbance for 5, 10, and 20 years. The soil fauna was sampled by two methods—via traps and soil monoliths measuring 25 x 25 x 20cm on each side, taken at a depth of 0-20 cm—and its diversity described with Shannon's (H), Simpson's (Is), and Pielou's (e) indices. Patterns in macrofaunal taxa were explored with the canonical discriminant analysis (CDA) and compared with physical, chemical, and microbiological attributes via canonical redundancy analysis (CRA). The CDA revealed significant separation between sites, taking into account sampling

methods and seasons. Total soil nitrogen, porosity, density, moisture, and the biological attributes dehydrogenase and urease activity were the most effective in distinguishing soils along the gradient of recovery. The monolith method produced consistently higher species richness, but there were no differences in diversity between sampling seasons. Diplopoda, Araneae, Pseudoscorpionida, Opiliones and Isoptera were associated with older sites and Hymenoptera with newer sites. The physical, chemical and biological composition of these soils has changed over time and with climate and these changes have affected soil fauna diversity.

Keywords: Canonical discriminant analysis; Canonical redundancy analysis; Edaphic soil macrofauna; Atlantic Forest Biome; Physical-chemical and biological attributes

4.1 Introdução

A macrofauna edáfica consiste de invertebrados maiores que 2 mm representados por Oligochaeta, Termitas e outros artrópodes maiores como Isopoda, Hymenoptera, Chilopoda, Diplipoda, Isoptera, Coleoptera, Araneae e Gastropoda. O benefício dos invertebrados do solo é cada vez mais reconhecido pelo papel ativo que desempenham no crescimento das plantas, na ciclagem de nutrientes (p. ex. 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; LAVELLE et al., 2006).

A ação detritívora de alguns grupos da fauna edáfica facilita a decomposição da serapilheira pela microbiota. Os engenheiros do solo tais como minhocas, cupins e larvas de coleópteros podem por ação digestiva eficiente alterar material orgânico e partículas minerais promovendo maior estabilização da matéria orgânica do solo e decompondo inclusive, compostos recalcitrantes à microbiota do solo como lignina, compostos húmicos e taninos (LAVELLE, 1997). A ingestão de partículas minerais e de resíduos orgânicos do solo, principalmente pelas minhocas, e sua disposição na superfície favorecem a agregação do solo. A formação de galerias, também é outro aspecto positivo porque melhoram a porosidade com efeitos positivos sobre a infiltração de água e difusão de gases e crescimento radicular. A macrofauna também é utilizada como bioindicadora de distúrbios (JOSCHKO et al., 2006; BARETTA; BROWN; CARDOSO, 2010). Por exemplo, algumas espécies de minhocas (p.ex.

Amyntas spp.) são conhecidas por afetar negativamente a mineralização de nitrogênio e reduzir os estoques de carbono do solo (BOHLEN et al., 2004).

Os microrganismos do solo também são utilizados como bioindicadores de qualidade do solo. A partir da biomassa microbiana, atividade enzimática, respiração basal e pela diversidade funcional e estrutural (RIFFALDI et al., 2002; CHEN et al., 2007; CHODAK; PIETRZYKOWSKI; NIKLINSKA, 2009) é possível medir a qualidade do material orgânico, sua contribuição para a ciclagem e disponibilidade de nutrientes, a influência do manejo sobre essa microbiota. Os microrganismos são bastante sensíveis ao impacto ambiental e dependem da ação da fauna em relação à aeração, revolvimento do solo, disponibilidade de nutrientes para exercer sua atividade (LAVELLE, 1997). Desse modo, em conjunto com a macrofauna, são úteis para comparar as áreas impactadas ou em recuperação e determinar ações mitigadoras.

No Brasil, dentre os vários ecossistemas impactados pela ação antrópica, destacam-se as matas ciliares, as quais são fundamentais para proteger os rios de assoreamento e de erosão dos solos, além de funcionar como refúgio para a fauna e como corredores ecológicos. Somente no estado de São Paulo existe aproximadamente 1,3 milhão de hectares de matas ciliares a serem recuperadas com um custo de recuperação de, aproximadamente, U\$ 2500,00 ha⁻¹ (BARBOSA, 2006; CHABARIBERY et al., 2008). As usinas de cana-de-açúcar têm se adequado às condições exigidas de manutenção ou recuperação das matas ciliares, principalmente devido à pressão mundial por produtos ambientalmente corretos. Assim, essas empresas investiram em 2007/2008 2,8 milhões de reais no plantio de mudas arbóreas e na manutenção de áreas reflorestadas e a preservação já chega em 260 mil ha de matas ciliares, de acordo com a União da Indústria de Cana-de-Açúcar (UNICA, 2010).

As áreas em recuperação de mata ciliar (anteriormente culturas agrícolas) principalmente aquelas próximas a grandes lavouras, sofrem com o efeito de borda (MURCIA, 2005) e com a presença de pesticidas, pragas e espécies invasoras que podem afetar o processo de recuperação devido ao efeito negativo sobre a macrofauna nativa. Além disso, a compactação do solo, a perda de carbono e de outros nutrientes, além de afetar negativamente a microbiota, são situações frequentes nas plantações agrícolas convencionais (KASCHUK; ALBERTON;

HUNGRIA, 2010; SILVA et al., 2011). Assim, o conhecimento sobre a macrofauna de áreas em diferentes estádios de recuperação e com diferentes condições edáficas é importante para se verificar o avanço da recuperação desses ambientes.

Acreditando que a fauna irá separar as áreas de acordo com o tempo de recuperação, apesar da diferença quanto aos atributos físicos ou do histórico de cultivo das áreas, o objetivo desse trabalho foi encontrar os grupos da macrofauna importantes para discriminar as áreas em diferentes estádios de recuperação (área nativa, 20, 10 e 5 anos de recuperação). Além disso, para verificar a sua influência sobre o processo de recuperação, a interação entre os grupos da macrofauna com os atributos físicos, químicos e microbiológicos do solo será analisada.

4.2 Desenvolvimento

4.2.1 Material e Métodos

4.2.1.1 Áreas de Coleta e Amostragem

As áreas estudadas são fragmentos de floresta Estacional Semidecídua pertencentes ao Bioma Mata Atlântica com diferentes estádios de recuperação ambiental sendo: 20 anos (R20), 10 anos (R10) e 5 anos (R05). Essas áreas foram comparadas com uma área nativa (NT) quanto aos atributos avaliados.

Apesar de todos os fragmentos pertencerem à floresta Estacional, estes apresentam algumas peculiaridades com relação ao solo e às causas de degradação. A área R20 é 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 (*Saccharum* sp.). A área R10 encontra-se em torno de uma represa de abastecimento envolvida por uma plantação de cana-de-açúcar. A área R05 foi anteriormente utilizada para a produção de culturas agrícolas anuais (*Phaseolus vulgaris* – Feijão e *Zea mays* – Milho) e também cana-de-açúcar. Essa área foi implantada com 18.350 mudas florestais, as quais possuem, atualmente, 5 a 10 metros de altura, em média. As características físicas e químicas das quatro áreas se encontram nas tabelas 2.1 e 2.2.

Em cada área foi definida uma grade de amostragem com 30 pontos de 100 m² em uma área de 2,5 hectares, sendo escolhidos aleatoriamente 15 pontos para serem analisados, separadamente. Quadrantes próximos entre si tiveram uma distância mínima de 20 metros entre os pontos de coleta, evitando-se o efeito da

autocorrelação. As coletas foram realizadas em duas épocas: Janeiro de 2010 (estação chuvosa) e Junho de 2010 (estação seca). As análises físico-químicas e biológicas (microbiológicas e macrofauna do solo) foram realizadas nos mesmos pontos de coleta (Figura 2.1). Amostras de solo foram coletadas na profundidade de 0-20 cm, peneiradas em 2 mm e mantidas a 4 °C para as análises microbiológicas e em temperatura ambiente para as análises químicas do solo.

4.2.1.2 Análise dos atributos Físicos e Químicos do Solo

Foram avaliadas a textura, a umidade, a densidade basal, a macroporosidade e a microporosidade (EMBRAPA, 1997). A percentagem de umidade foi calculada pela diferença entre 10 g de solo fresco e o seco a 105 °C por 24 horas. A análise química do solo foi feita seguindo as metodologias descritas em Raij et al. (2001), sendo avaliado: pH do solo em KCl e em H₂O, fósforo disponível (resina), Potássio (Mehlich 1), Alumínio (KCl), H+Al (SMP), Ca (resina), Mg (resina), SB (Soma de Bases), CTC (capacidade de troca de cátions). O carbono e o nitrogênio total do solo foram analisados pelo método de combustão total utilizando o analisador elementar LECO-CN 2000. O solo foi peneirado em peneiras de 2 mm, seco ao ar e moído para a leitura no aparelho. O N-NH₄⁺ e N-NO₃⁻ do solo foram analisados por destilação utilizando solo úmido (KEENEY; NELSON, 1982).

4.2.1.3 Análise Microbiológica do Solo

Para determinação do carbono da biomassa microbiana (CBM) das amostras de solo foi utilizado o método de fumigação-extração (VANCE; BROOCKS; JENKINSON, 1987), utilizando o coeficiente de conversão $k_c=0,4$ para os cálculos do carbono da biomassa microbiana (KASCHUK; ALBERTON; HUNGRIA, 2010). O nitrogênio da biomassa microbiana (NBM) foi determinado seguindo o método de fumigação-extração, sendo quantificado pelo método da ninhidrina (JOERGENSEN; BROOKES, 1990) e coeficiente de conversão $k_n = 0,54$ para os cálculos de nitrogênio da biomassa microbiana (KASCHUK; ALBERTON; HUNGRIA, 2010). A atividade microbiana foi determinada através da respiração basal das amostras de solo (C-CO₂) em amostras de 50 g de solo incubadas por 20 dias, a 28°C (ALEF, 1995). A partir dos resultados de CBM e carbono total foi calculado o quociente metabólico (qCO_2).

Os amonificantes foram determinados pelo método do número mais provável (NMP) seguindo Sarathchandra (1978). As enzimas analisadas foram desidrogenase (CASIDA; KLEIN; SANTORO, 1964) urease (EC 3.5.1.5.) (TABATABAI; BREMNER, 1972), celulase (EC 3.2.1.4) (SCHINNER; MERSI, 1990), fosfatases ácida e alcalina (TABATABAI; BREMNER 1969).

4.2.1.4 Macrofauna

Em cada área, amostras de solo para avaliação da macrofauna foram coletadas nos mesmos pontos de amostragem dos demais atributos edáficos. Para tanto, foi usado o método de escavação e triagem manual de monólitos (25×25x20 cm) (ANDERSON; INGRAM, 1993; BARETTA et al., 2007a), na profundidade de 0-20 cm. A coleta de macrofauna também foi realizada por meio de armadilhas 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 área (BARETTA et al, 2007b). Nas armadilhas foram colocados 200 mL de solução detergente, na concentração de 2,5%. Quinze armadilhas foram instaladas em cada área, distantes no máximo 0.5m dos pontos de coleta pelo método de escavação de monólitos. Após a retirada das armadilhas, as amostras foram 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 foram conservados em recipientes com tampa em solução de álcool etílico 70 %.

No laboratório, os organismos foram separados e identificados, com auxílio de literatura específica. A diversidade da fauna foi expressa por: 1- riqueza, que mede o número de espécies em relação ao número de indivíduos coletados em uma determinada comunidade; 2- índice de diversidade de Shannon (H), o qual mede a diversidade levando em consideração número de espécies e equitabilidade e considera o princípio da incerteza em prever a espécie do indivíduo retirado; 3- índice de dominância de Simpson (Is) o qual aumenta com a riqueza e com a equitabilidade e supõe que dois indivíduos independentemente retirados ao acaso sejam da mesma espécie e 4- índice de uniformidade de Pielou (e) derivado do índice de diversidade de Shannon e representa homogeneidade da distribuição dos indivíduos entre as espécies (ODUM, 1983). Esses índices foram calculados segundos as fórmulas:

Shannon (H):

$$H' = - \sum_{i=1}^S \frac{n_i}{N} \cdot \ln \frac{n_i}{N}$$

Pielou (e):

$$e = \frac{H}{H_{\max}} \quad \text{em que } H_{\max} = \ln S$$

Simpson (Is):

$$I_s = 1 - \sum_{i=1}^S \frac{n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

Em que: S = número total de espécies, N = número total de indivíduos amostrados, ni= número de indivíduos amostras na i-ésima espécie.

Os grupos utilizados nos cálculos dos índices foram: Hymenoptera, Isoptera, Coleoptera (Larva), Orthoptera, Coleoptera, Thysanoptera, Diptera, Lepidoptera, Lepidoptera (Larva) Araneae, Chilopoda, Diplopoda, Grylloblattodea, Isopoda, Formicidae e Oligochaeta.

4.2.1.5 Análise Estatística

Os índices de riqueza e diversidade foram avaliados por meio de ANOVA e teste de média LSD ($p \leq 0,05$).

Os valores dos atributos edáficos (físicos, químicos e biológicos) foram utilizados para a obtenção do comprimento do gradiente, a partir do software CANOCO versão 4.0 (BRAAK; SMILAUER, 1998; BARETTA et al., 2010). A fauna edáfica foi utilizada como variável resposta e as variáveis físicas e químicas do solo como variáveis ambientais explicativas.

Os atributos físicos, químicos e biológicos foram utilizados para separar as áreas quanto às principais características ambientais indicadoras, por meio da análise de redundância (RDA). As variáveis químicas e físicas foram submetidas ao programa SAS 9.2 e analisadas por meio dos valores de inflação quanto à possível multicolinearidade entre os dados, além de serem selecionadas quanto às mais

importantes para a separação das áreas estudadas pelo comando *Forward Selection* ($p \leq 0,05$).

A macrofauna (TSBF e Armadilhas) foi submetida à análise canônica discriminante (ACD) utilizando o programa SAS versão 9.2 (SAS Institute, 1999) comparando-se as duas épocas de coleta. Após a análise de ACD os coeficientes canônicos homogeneizados (HCC), o coeficiente de correlação (r) e a taxa de discriminação paralela ($TDP=r \times HCC$) foram calculados. Quanto maiores os valores de TDP maior é a força da variável em discriminar as áreas estudadas (BARETTA et al., 2010). Os maiores valores positivos de TDP são os que possuem mais peso para separar as áreas (MOREIRA et al., 2007). Valores entre 0.1 a 0.2 são bons, entre 0.2 a 0.4 são muito bons, entre 0.4 a 0.8 são ótimos e acima de 0.81 são excelentes para discriminar as áreas (BARETTA et al., 2010). O coeficiente de correlação r reflete o papel individual de cada variável e o coeficiente canônico homogeneizado (CCH) explica a separação entre as áreas de acordo com uma visão multivariada dos dados. Contudo, a TDP é geralmente adotada como sendo a melhor para identificar o peso de cada atributo do solo para separar as áreas estudadas (BARETTA et al., 2010).

Quando verificada diferença significativa entre as áreas estudadas, por meio da ACD, foi realizado teste de comparação de médias nos valores dos CCH, nas distintas funções canônicas, por meio do teste de LSD ($p \leq 0,05$), conforme CRUZ-CASTILLO et al. (1994).

4.2.2 Resultados e Discussão

Ao todo, foram coletados 1340 e 4979 indivíduos pelo método TSBF, no verão, e no inverno, respectivamente. Pelo método de armadilhas esses valores foram bem menores, com 534 indivíduos coletados, no verão, e 1969 indivíduos, no inverno. Observa-se, maior número de indivíduos para os dois métodos de coleta no inverno, o que comprova a influência da sazonalidade sobre a abundância da macrofauna. A riqueza da macrofauna, retirada pelo método de TSBF, foi maior nas áreas mais antigas tanto na época chuvosa (NT diferente da área R05), quanto na seca (NT e R20 diferentes das demais) (Figura 4.1). Observou-se diferença significativa para os índices H, Is e e na época seca (Figura 4.1 B), sendo os

maiores valores dos índices de diversidade encontrados nas áreas mais antigas dos estádios de recuperação.

Essa melhor separação das áreas no inverno pode ser devido à maior disponibilidade de nutrientes nessa época devido à menor taxa de decomposição da matéria orgânica pela microbiota (capítulo 2). Assim, com maior quantidade de recursos, a fauna de ambientes mais antigos em que existe maior diversidade de plantas terá uma maior disponibilidade de recursos. No verão, a ausência de serapiação das áreas quanto aos índices pode ser relacionada a uma maior atividade da fauna por busca de recursos e uma maior influência de grupos invasores nas áreas mais novas.

Os índices H, Is e e menores indicam perda da diversidade e redução da equitabilidade (MOÇO et al., 2005). Moço et al. (2005) encontraram essa redução no inverno em ambientes de floresta não preservada e em plantações de eucalipto (*Eucalyptus* sp) em regiões predominantemente de floresta ombrófila densa, formações montana, submontana e vertente atlântica, localizadas no norte fluminense. Baretta et al. (2007b), ao estudarem o efeito de diferentes florestas de *Araucaria angustifolia*, tanto nativas quanto reflorestadas, impactadas ou não, verificaram que existe efeito de sazonalidade sobre as famílias de aranhas. Esses autores ainda encontraram maiores valores de abundância e diversidade na área nativa, mostrando o impacto da intervenção antrópica sobre a diversidade da fauna edáfica. Baretta et al. (2010) também encontraram maior riqueza e abundância de macrofauna em áreas não-impactadas quando compararam áreas nativas com reflorestadas de *Araucaria angustifolia*.

Miller, Budy e Schmidt (2010), ao estudarem o efeito da heterogeneidade de hábitat de regiões de rios em uma meta-análise de 24 regiões, verificaram que ambientes recuperados possuíam em média 14 % de riqueza maior e 28% de maior densidade de espécies quando comparados com ambientes não recuperados. Pauli et al. (2011), ao compararem quatro diferentes usos da terra (Floresta secundária, agrofloresta com 2 e 10 anos e um sistema silvopastoril) na região Sudoeste de Honduras, com clima equatorial e solo do tipo Entisol, reportaram que a composição da comunidade da macrofauna variou pouco entre os tipos de uso da terra. Isso devido ao tipo de manejo que ajudou na manutenção da cobertura vegetal, da matéria orgânica, da cobertura da serapilheira e da umidade do solo.

Pelo método de armadilhas, apesar de não ter havido relação entre os índices e os tempos de recuperação na época chuvosa (Figura 4.2), encontrou-se maior riqueza na área R20 em comparação às áreas NT e R10 e maior diversidade em relação às outras três áreas. Riqueza e diversidade geralmente são maiores em ambientes intermediários no estágio sucessional, pois possuem maior heterogeneidade de hábitat devido à maior diversidade de espécies de planta, e com isso, maior quantidade de alimentos e abrigo (SALMON; FRIZZERA; CAMARET, 2008). Isso pode ter influenciado no maior valor do índice de diversidade de Shannon na área R20 quanto ao método de armadilha. Nesse método, a fauna coletada está em contato direto com a serapilheira e pode, desse modo, depender mais da diversidade de espécies e do material a ser decomposto.

Na época seca não houve diferença entre as áreas quanto à riqueza da macrofauna e os índices H' e d' foram menores na R20 quando comparada com as demais áreas pelo método de armadilhas (Figura 4.2 B). Isso mostra o efeito sazonal sobre a diversidade da macrofauna edáfica. Moço et al. (2005), encontraram maior densidade e riqueza de fauna em floresta natural ao comparar povoamento de eucalipto com pasto. Estes autores ainda encontraram maior diferença entre as áreas estudadas no verão, concluindo que a época de coleta influencia a riqueza e a diversidade da fauna. Ainda pelo método por armadilha em relação à coleta no inverno, a ausência de significância em relação à área R05, quanto à influência da idade das áreas, pode ser explicada pela floresta menos densa e mais aberta, o que pode favorecer a circulação e a entrada de novos indivíduos.

Baretta et al. (2007b), ao estudarem diversidade de aranhas em áreas nativas e reflorestadas de *Araucaria angustifolia*, encontraram maior número de espécimes quando utilizando TSBF, porém maior riqueza e diversidade utilizando armadilhas, provavelmente devido ao comportamento de superfície geralmente predominante nas aranhas e outros animais predadores. Negrete-Yankelevich et al. (2007) também encontraram maior abundância de macrofauna no solo quando comparado com a serapilheira e ainda maior diversidade em áreas mais antigas no estágio sucessional tanto para macroinvertebrados do solo quanto da serapilheira. Maior riqueza foi encontrada em nosso trabalho principalmente utilizando TSBF (Figura 4.1). Isso, provavelmente, tenha relação com a maior quantidade de animais capturados pelo método de TSBF e com a melhor qualidade do material orgânico (menor relação C:N da serapilheira da área nativa) e maior diversidade vegetal na

área nativa e na área R20. Maior cobertura e diversidade vegetal e mais material orgânico e nutrientes no solo podem influenciar a riqueza e a diversidade de espécies (PODGAISKI; RODRIGUES, 2010; MILLER; BUDY; SCHMIDT, 2010).

Figura 4.1 - Valores de riqueza e índices (Shannon, Simpson e Pielou) da macrofauna edáfica avaliada pelo método TSBF para as florestas nativa - controle (NT), com 20 anos (R20), com 10 anos (R10) e com 5 anos (R05), na época chuvosa (A) e seca (B), Áreas contendo letras iguais não diferem entre si pelo teste de LSD ($p \leq 0,05$)

Figura 4.2 - Valores de riqueza e índices (Shannon, Simpson e Pielou) da fauna edáfica coletada pelo método das armadilhas (Pitfall traps) para as quatro áreas (NT, R20, R10 e R05) na época chuvosa (A) e seca (B). Áreas contendo letras iguais não diferem entre si pelo teste de LSD ($p \leq 0,05$)

Os testes multivariados de Wilks Lambda, Pillai Trace, Hotelling-Lawley e Roy mostraram alta significância quanto à existência de efeito multivariado em relação a separação das áreas estudadas ($p < 0,0001$) para as duas épocas e para os dois métodos (TSBF e Armadilhas).

Na análise canônica discriminante (ACD), foram consideradas variáveis com valores de TDP superiores a 0,1 como boas indicadoras de qualidade para discriminação das áreas. Pelo método do TSBF, a FCD 1 explicou 62 % enquanto que a FCD 2 explicou apenas 24 % da separação das áreas (Figura 4.3 A). Diplopoda, Hymenoptera e Outros (Lepidoptera, Larvas de Lepidoptera, Griloblattodea, Thysanoptera) foram os principais grupos da fauna que separaram as áreas mais jovens (R10 e R05) das mais antigas (NT e R20) na estação chuvosa, de acordo com o teste de comparação de média LSD dos valores dos coeficientes canônicos homogeneizados (Tabela 4.1, Figura 4.3 A). O grupo Diplopoda tem sido reportado como sendo indicador de qualidade principalmente devido a sua ligação com ambientes mais estáveis (MORÓN-RÍOS et al., 2010).

Na seca, Diplopoda, Araneae e Coleoptera foram importantes para discriminar as áreas (LSD, $p \leq 0,05$), sendo que a FCD1 e a FCD2 explicaram 64 e 22 %, respectivamente (Tabela 4.1, Figura 4.3 B). Negrete-Yankelevich et al. (2007), ao estudarem mudanças da macrofauna em diferentes estádios sucessionais, encontraram menor riqueza e abundância em relação aos grupos de Diplopoda e Chilopoda.. Em nosso trabalho tanto Diplopoda quanto Chilopoda foram importantes para separar as áreas pela análise discriminante, principalmente no verão.

Várias famílias de Araneae (BARETTA et al., 2007b) e de Coleoptera (MERLIM et al., 2006) foram identificadas como indicadoras de intervenção antrópica em Florestas de Araucária nativa e implantada pela queima accidental. O grupo Araneae é representado por predadores habitantes da serapilheira e depende de ambientes com maior disponibilidade e diversidade de alimentos, o que pode ter sido um fator importante para discriminar as áreas NT da R05, no inverno (Figura 4.3 B). Contudo, no verão, Araneae foi importante para unir as áreas NT e R05, provavelmente devido a uma elevação de espécies mais relacionadas a ambientes impactados. Pelo método de armadilhas, o grupo Araneae foi importante para unir as áreas R10 e R05 com a área NT, na estação seca. O grupo de Coleoptera que é muito dependente da umidade e de matéria orgânica teve comportamento

semelhante ao grupo Araneae, pelo o método TSBF. Por ser um grupo bastante diverso e alguns deles serem responsáveis pela dispersão da matéria orgânica e dependente da qualidade e da quantidade da serapilheira, foi importante para separar a área NT das áreas R10 e R05, na seca.

Tabela 4.1 - Valores dos coeficientes canônicos homogêneos (HCC), correlação canônica (r) e Taxa de Discriminação Paralela (TDP: $r \times HCC$) referentes à análise canônica discriminante (ACD) quanto aos grupos da macrofauna edáfica avaliada pelo método TSBF, nas duas épocas de coleta, independente da área avaliada. Valores em negrito representam os atributos mais importantes para discriminar as áreas de estudo (n=60; 15x4 áreas)

Grupos da Macrofauna	Época Chuvosa						Época Seca					
	HCC		R		TDP		HCC		r		TDP	
	FCD1	FCD2	FCD1	FCD2	FCD1	FCD2	FCD1	FCD2	FCD1	FCD2	FCD1	FCD2
Hymenoptera	-0.350	0.550	-0.301	0.507	0.105	0.279	-0.292	0.015	-0.179	-0.044	0.052	-0.001
Isopoda	-0.003	0.090	-0.121	0.112	0.000	0.010	-0.031	-0.232	-0.237	-0.301	0.007	0.070
Coleoptera	0.267	0.763	0.269	0.232	0.072	0.177	0.358	-0.305	0.398	-0.307	0.142	0.094
Araneae	0.362	0.440	0.261	0.269	0.094	0.119	0.342	-0.640	0.389	-0.223	0.133	0.143
Chilopoda	-0.011	-1.099	0.189	-0.240	-0.002	0.263	0.107	0.733	0.114	0.495	0.012	0.363
Diplopoda	0.615	0.004	0.602	-0.110	0.370	0.000	0.827	0.165	0.511	0.013	0.423	0.002
Outros	0.488	0.439	0.358	0.204	0.174	0.090	0.201	0.588	0.248	0.342	0.050	0.201
Blattodea	-0.204	0.544	-0.196	0.063	0.040	0.034	0.037	0.099	-0.126	0.270	-0.005	0.027
Enchytraeidae	-0.239	-0.143	-0.061	-0.163	0.015	0.023	0.158	-0.080	0.117	-0.173	0.018	0.014
Mollusca	0.374	0.118	0.206	-0.044	0.077	-0.005	-0.557	-0.348	-0.119	-0.212	0.066	0.074
Oligochaeta (Minhocas)	-0.226	0.095	-0.237	0.113	0.054	0.011	-0.372	0.168	-0.228	0.287	0.085	0.048
Pseudoscorpionida	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	-0.052	0.143	0.231	-0.173	-0.012	-0.025
Opiliones	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	0.232	-0.079	0.118	0.124	0.028	-0.010

Tabela 4.2 - Valores dos coeficientes canônicos homogeneizados (HCC), correlação canônica (r) e Taxa de Discriminação Paralela (TDP: r x HCC) referentes à análise canônica discriminante (ACD) quanto aos grupos da macrofauna edáfica avaliada pelo método armadilhas, nas duas épocas de coleta, independente da área avaliada. Valores em negrito representam os atributos mais importantes para discriminar as áreas de estudo (n=60; 15x4 áreas)

Grupos da Macrofauna	Época Chuvosa						Época Seca					
	HCC		R		TDP		HCC		r		TDP	
	FCD1	FCD2	FCD1	FCD2	FCD1	FCD2	FCD1	FCD2	FCD1	FCD2	FCD1	FCD2
Hymenoptera	-0.019	0.119	0.114	0.077	-0.002	0.009	0.871	-0.083	0.770	0.019	0.671	-0.002
Coleoptera	-0.112	-0.338	-0.062	-0.098	0.007	0.033	0.070	-0.039	0.369	-0.207	0.026	0.008
Araneae	-0.191	0.380	0.173	0.155	-0.033	0.059	0.262	0.756	0.128	0.675	0.034	0.511
Chilopoda	-0.168	0.466	-0.099	0.224	0.017	0.105	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>
Diplopoda	1.105	-0.105	0.866	0.215	0.958	-0.022	0.182	0.159	0.305	0.077	0.056	0.012
Isopoda	-0.207	0.638	-0.097	0.352	0.020	0.224	0.369	-0.499	0.092	-0.142	0.034	0.071
Outros	-0.213	-0.430	-0.236	-0.443	0.050	0.190	-0.036	0.025	0.075	0.014	-0.003	0.000
Mollusca	-0.087	0.399	0.300	0.247	-0.026	0.099	-0.666	1.553	0.001	0.258	-0.001	0.400
Blattodea	-0.349	0.655	-0.221	0.453	0.077	0.297	0.088	0.109	0.262	0.030	0.023	0.003
Opiliones	-0.254	0.085	0.266	0.084	-0.068	0.007	-0.324	-0.034	-0.332	-0.073	0.108	0.002
Thysanoptera	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	0.776	-0.949	0.068	0.008	0.053	-0.007

Outros= Somatório de grupos menos freqüentes (Griloblattodea, Lepidoptera, Larvas de Lepidoptera e Orthoptera)

nd – não determinado

Figura 4.3 - Relação entre as funções discriminantes canônicas 1 e 2 (FDC1 e FDC2) referentes aos coeficientes canônicos homogeneizados (HCC) para a macrofauna edáfica avaliada pelo método TSBF nas épocas Chuvosa (A) e Seca (B). Áreas seguidas pela mesma letra, em cada função discriminante canônica, não diferiram entre si pelo teste LSD ($p \leq 0,05$)

O grupo Hymenoptera (representado pelas formigas, neste trabalho) são insetos bioindicadores de ambientes impactados, relacionados especialmente com ambientes em recuperação (BARETTA et al., 2006). Moço et al. (2005) encontraram maior predominância de Hymenoptera em ambientes impactados quando comparados com floresta preservada. Algumas espécies de Hymenoptera podem ser muito agressivas em recolonizar áreas impactadas devido a sua ampla utilização de recursos orgânicos (BENITO et al., 2004). Grupos predadores como Araneae, Pseudoscorpionida e Opiliones e detritívoros como Diplopoda, estão relacionados com a melhoria de qualidade do solo (PAOLETTI, 1999; BARETTA et al., 2010), o que condiz com a maior predominância desses grupos em áreas mais antigas. Benito et al. (2004) encontraram maior abundância e dominância de predadores (Chilopoda, Araneae e Pseudoscorpionida) em áreas de cerrado nativo quando comparado com cerrado desflorestado e com pasto em diferentes idades, contendo *Brachiaria brizantha* em consórcio com a leguminosa *Stylosanthes guianensis*. Contudo, esses autores encontraram maior abundância de diplopoda nas áreas de pastagem.

No método de armadilhas, na época chuvosa, Diplopoda foi também o principal grupo que discriminou as áreas, separando a área R20 das demais (LSD $P<0.05$) (Tabela 4.2, Figura 4.4 A). Na época seca, Hymenoptera e Opiliones se destacaram, separando a área NT das demais e a área R20 da R10 pela FCD 2 (LSD $P<0.05$) (Tabela 4.2, Figura 4.4 B). Araneae e Mollusca foram os mais importantes para discriminar as áreas no eixo 2 (LSD $P<0.05$).

Figura 4.4 - Relação entre as funções discriminantes canônicas 1 e 2 (FDC1 e FDC2) referentes aos coeficientes canônicos homogeneizados (HCC) da fauna avaliada pelo método das armadilhas (*Pitfall traps*) nas épocas chuvosa (A) e seca (B). Áreas seguidas pela mesma letra, em cada função discriminante canônica, não diferiram entre si pelo teste LSD ($p \leq 0.05$)

De modo geral, a análise de redundância (RDA) mostra a importância dos atributos físicos, químicos e biológicos do solo, como umidade, densidade, atividade microbiana, carbono e nitrogênio do solo para discriminar as áreas quanto aos grupos da macrofauna. Alguns destes atributos podem ser bons indicadores de qualidade do solo (BARETTA et al., 2006; VELASQUEZ; LAVELLE; ANDRADE, 2007) e são importantes para separar as áreas e ajudar a explicar a presença ou ausência dos grupos da macrofauna edáfica (BARETTA et al., 2010). Por exemplo, Morón-Ríos et al. (2010), ao simularem o efeito da precipitação sobre a comunidade dos macroinvertebrados do solo, em áreas com e sem pastejo de ovelhas, verificaram que, a irrigação utilizada no período de seca entre o outono e inverno aumenta a abundância de Oligochaeta e Diplopoda, importantes decompositores do solo.

Na RDA, pelo método do TSBF, Diplopoda, Araneae e outros ficaram mais relacionados com as áreas NT e R20 e Isoptera, Coleoptera, Mollusca e Chilopoda com a área R20, na época chuvosa (Figura 4.5 A). Essas áreas também tiveram maior atividade de enzimas (desidrogenase e urease) e maior concentração de nitrogênio do solo. Além disso, observa-se relação negativa da densidade do solo sobre os indicadores biológicos e químicos e também sobre os grupos da fauna edáfica destacados acima (Figura 4.5), o que está de acordo com outros trabalhos (LI; MA; ZHANG, 2002; MÄDER et al., 2002). Esses atributos microbiológicos e químicos do solo são importantes indicadores de qualidade do solo, sendo utilizados para estudar a saúde do solo (BARETTA et al., 2008; BASTIDA et al., 2008).

As enzimas desidrogenase e urease possuem maior atividade em ambientes mais estáveis e com maior conteúdo de carbono e nitrogênio (SALAZAR et al., 2011). O nitrogênio do solo muitas vezes está relacionado com uma melhor qualidade do material orgânico, o que implica melhor ciclagem de nutrientes, maior quantidade de recursos e, conseqüentemente, maior diversidade de fauna (NEGRETE-YANKELEVICH et al., 2007), seja ela predadora (topo de cadeia) ou detritívora.

Figura 4.5 - Análise de Redundância entre as quatro áreas (nativa, R20, R10 e R05) nas épocas chuvosa (A) e seca (B) referente à macrofauna edáfica avaliada pelo método TSBF e sua relação com atributos físicos, químicos e biológicos do solo. Outros: somatório de Lepidoptera, Larvas de Lepidoptera, Griloblattodea e Thysanoptera. Setas NT, R20, R10 e R05 representam o centróide.

Na seca, a atividade microbiana do solo, representada pela desidrogenase, o nitrogênio do solo e a macroporosidade foram mais relacionados à NT e aos grupos da fauna Isoptera, Coleoptera, Araneae e Pseudoscorpionida. Diplopoda também teve relação intermediária com a área NT e com a R20 (Figura 4.5 B). Ainda foi maior a relação de Chilopoda, Mollusca, Opiliones e Outros (Lepidoptera, Larvas de Lepidoptera, Griloblattodea, Thysanoptera) com a R20 e com a umidade do solo. Nahmani e Rossi (2003), ao buscarem por indicadores da fauna relacionados com poluição de solo por metal pesado, encontraram duas espécies de diplopoda mais relacionadas às áreas poluídas. Entretanto essa relação se deve ao maior conteúdo de serapilheira devido à baixa decomposição nestes sítios, pois os diplopoda são favorecidos pela quantidade e qualidade da serapilheira e pela condição de umidade (MORÓN-RÍOS et al., 2010). A atividade da desidrogenase possui relação com o carbono e com o nitrogênio do solo (tabela 2.3, capítulo 2) e por representar a produção de energia a partir de uma fonte de carbono depende tanto da quantidade quanto da qualidade do material orgânico. Essa melhor qualidade do material orgânico pode ser representada pela maior concentração de nitrogênio do solo a qual é diretamente dependente do material presente da serapilheira a ser decomposto. Essas características podem, portanto, representar a quantidade e também a qualidade da serapilheira e, por isso, foi encontrada uma relação entre os grupos da fauna (p. ex Diplopoda) e também dos atributos químicos e microbiológicos, citados acima, com a área NT.

O grupo Oligochaeta mostrou-se mais relacionado à área R05 nas duas épocas (Figura 4.5). É importante observar que o grupo Oligochaeta, englobando a maioria das minhocas, esteve, nas duas épocas, relacionado à umidade do solo. As minhocas são importantes engenheiros do solo, pois modificam a porosidade, aumentam a aeração e a infiltração de água, redistribuem as partículas orgânicas do solo (LAVELLE, 1997) e geralmente preferem ambientes mais úmidos (PAOLETTI, 1999; MARÓN-RÍOS et al., 2010). A umidade foi um fator importante para a distribuição dos grupos da macrofauna, contudo, parece que a sua relação com as áreas está ligada às características físicas do solo, como conteúdo de argila e porosidade (Figura 4.5 B). Baretta et al. (2010) também encontraram relação entre umidade e macrofauna em áreas naturais e reflorestadas de *Araucaria angustifolia*.

Solos com menor microporosidade tendem a reter maior umidade (DEXTER, 2004). Devido a isso, principalmente no método de TSBF, pela RDA, as áreas R05 e

R20, que têm maior microporosidade (Tabela 2.1), ficaram mais relacionadas com a umidade do solo, o que influenciou na distribuição da fauna edáfica entre as quatro áreas estudadas.

Pelo método de armadilhas, na época chuvosa, Diplopoda, Mollusca, Araneae, Opiliones ficaram mais relacionados com a área R20 e com a umidade de acordo com a análise de RDA (Figura 4.6 A). Blattodea e Isopoda ficaram mais relacionados com a área R05, acompanhadas da densidade do solo, concentração de cálcio e também com a umidade. A atividade enzimática da desidrogenase e da fosfatase alcalina ficou mais relacionada às áreas R10 e NT. Na seca, poucos atributos ambientais foram importantes para discriminar as áreas quanto à distribuição dos grupos da macrofauna (Figura 4.6 B). Contudo, observou-se alta relação entre a área NT com Opiliones, Hymenoptera e Diplopoda com a R20 e Araneae com a R10. Destaca-se ainda, relação entre a área R05 e Thysanoptera, utilizando-se armadilhas e com Isopoda, nos dois métodos e nas duas épocas de coleta, tendo relação com a umidade do solo (Figura 4.6).

O grupo de Thysanoptera pode se alimentar de tecidos foliares e de fungos, sendo algumas espécies reconhecidas como pragas agrícolas (MOUND, 2005). Provavelmente a presença de Thysanoptera esteja relacionada com ao ambiente agrícola anteriormente encontrado na área R05. Entretanto, são praticamente inexistentes os trabalhos relatando o grupo Thysanoptera como indicador de qualidade do solo. Marón-Rios et al (2010) encontraram maior abundância de Isopoda em ambientes com irrigação ao longo de todo o ano devido à baixa capacidade desse grupo em regular a umidade corporal.

Figura 4.6 - Análise de Redundância entre as quatro áreas (nativa, R20, R10 e R05) nas épocas chuvosa (A) e seca (B), referente à fauna edáfica, avaliada pelo método de armadilhas (*Pitfall traps*), e sua relação com atributos físicos, químicos e biológicos do solo. Outros: Somatório de Griloblattodea, Lepidoptera, Larvas de Lepidoptera e Orthoptera. Setas NT, R20, R10 e R05 representam o centróide.

4.3 Conclusões

- A umidade do solo e a sazonalidade influenciaram na distribuição da macrofauna, assim como os atributos físicos densidade e porosidade.
- os indicadores microbiológicos como atividade da urease e da desidrogenase, foram coerentes com os grupos da fauna encontrados em áreas com estádios mais avançados da recuperação
- os grupos da fauna foram importantes para separar as áreas em diferentes estádios de recuperação.
- Dentre os principais grupos da fauna edáfica destacam-se os predadores (Araneae, Pseudoscorpionida e Opiliones) e também Diplopoda e Isoptera, os quais foram mais relacionados com as áreas mais antigas.
- O grupo dos Hymenoptera (representado pelas formigas neste trabalho) foi mais encontrado nas áreas mais novas.

Referências

- ALEF, K. Soil respiration. In: ALEF, K.; NANNPIERI, P. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. Amsterdam: Academic Press, 1995. p. 234-245.
- ANDERSON, J.M.; INGRAM, J.S.I. **Tropical soil biological and fertility: a handbook of methods**. 2nd ed. Wallingford. CAB International, 1993. 221 p.
- ASSAD, M.L.L. Fauna do solo. In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. **Biologia dos solos dos Cerrados**. Brasília: EMBRAPA, CPAC, 1997. p. 363-443.
- BARBOSA, L.M. **Manual para recuperação de áreas degradadas do estado de São Paulo: matas ciliares do interior paulista**. São Paulo: Instituto de Botânica, 2006. 128 p.
- BARETTA, D.; BARETTA, C.R.D.M.; CARDOSO, E.J.B.N. Análise multivariada de atributos microbiológicos e químicos do solo em florestas com *Araucaria angustifolia*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 2683-2691, 2008.
- BARETTA, D.; BROWN, G.G.; CARDOSO, E.J.B.N. Potencial da Macrofauna e outras variáveis edáficas como indicadores da qualidade do solo em áreas com *Araucaria angustifolia*. **Acta Zoológica Mexicana** (n.s), Xalapa, n. 2, p. 135-150, 2010.
- BARETTA, D.; BRESOVIT, A.D.; KNYSACK, I.; CARDOSO, E.J.B.N. Trap and soil monolith sampled edaphic spiders (Arachnida: Araneae) in *Araucaria angustifolia* forest. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, n. 4, p. 375-383, 2007b.

BARETTA, D.; BROWN, G.G.; JAMES, S.W.; CARDOSO, E.J.B.N. Earthworm Populations sampled using collection methods in Atlantic Forests with *Araucaria angustifolia*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, n. 4, p. 384-392, 2007a.

BARETTA, D.; MAFRA, Á.L.; SANTOS, J.C.P.; AMARANTE, C.V.T. do; BERTOL, I. Análise multivariada da fauna edáfica em diferentes sistemas de preparo e cultivo do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 11, p. 1675-1679, 2006.

BASTIDA, F.; ZSOLNAY, A.; HERNANDEZ, T.; GARCIA, C. Past, present and future of soil quality indices: A biological perspective. **Geoderma**, Amsterdam, v. 147, n. 3/4, p. 159-171, 2008.

BENITO, N.P.; BROSSARD, M.; PASINI, A.; GUIMARAES, M.F.; BOBILLIER, B. Transformations of soil macroinvertebrate populations after native vegetation conversion to pasture cultivation (Brazilian Cerrado). **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 40, n. 3/4, p. 147-154, 2004.

BOHLEN, P.J.; SCHEU, S.; HALE, C.M.; MCLEAN, M.A.; MIGGE, S.; GROFFMAN, P.M.; PARKINSON, D. Non-native invasive earthworms as agents of change in northern temperate forests. **Frontiers in Ecology and the Environment**, Washington, v.2, p.427-435, 2004.

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. Effects of earthworms on plant production in the tropics. In: LAVELLE, P.; BRUSSAARD, L.; HENDRIX, P. **Earthworm management in tropical agroecosystems**. Wallingford: CABI, 1999. p. 87-147.

CASIDA, L.E.; KLEIN, D.A.; SANTORO, T. Soil dehydrogenase activity. **Soil Science**, Philadelphia, v. 98, p. 371-376, 1964.

CHABARIBERY, D.; SILVA, J.R. da; TAVARES, L.F.J.; LOLI, M. V.B.; SILVA, M.M. da; MONTEIRO, A.V.V.M. Riparian forest recovery: systems of native forest formation in family farming. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 38, p. 7-20, 2008.

CHEN, M.M.; ZHU, Y.G.; SU, Y.H.; CHEN, B.D.; FU, B.J. MARSCHNER, P. Effects of soil moisture and plant interactions on the soil microbial community structure. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 43, n.1, p. 31-38, 2007.

CHODAK, M.; PIETRZYKOWSKI, M.; NIKLIŃSKA, M. Development of microbial properties in a chronosequence of sandy mine soils. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 41, n. 3, p. 259-268, 2009.

CRUZ-CASTILLO, J.G.; GANESHANANDAM, S.; MACKAY, B.R.; LAWES, G.S.; LAWOKO, C.R.O.; WOOLLEY, D.J. Applications of canonical discriminant analysis in horticultural research. **HortScience**, Alexandria, v. 29, n. 10, p. 1115-1119, 1964.

DECAËNS, T.; RANGEL, A.F.; ASAKAWA, N. THOMAS, R.J. Carbon and nitrogen dynamics in situ ageing earthworm casts in grasslands of the eastern Plains of Colombia. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v. 30, p. 20-28, 1999.

DEXTER, A.R. Soil physical quality Part I. Theory, effects of soil texture, density, and organic matter, and effects on root growth. **Geoderma**, Amsterdam, v. 120, n. 3/4, p. 201-214, 2004.

DORAN, J.W.; PARKIN, T.B. Defining and assessing soil quality. In: DORAN, J.W., COLEMAN, D.C.; BEZDICEK, D.F.; STEWARD, B.A. **Defining soil quality for sustainable environment**. Madison: Soil Science Society of America, 1994. p. 3-21. (Special Publication, 35).

EMBRAPA. Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos. **Manual de métodos de análise de solo**. Rio de Janeiro, 1997. 212 p.

FRIGHETTO, R.T.S.; VALARINI, P.J. **Indicadores biológicos e bioquímicos da qualidade do solo**: manual técnico. Jaguariúna: EMA, 2000. 198 p.

GATIBONI, L.C.; KAMINSKI, J.; RHEINHEIMER, D.S.; BRUNETTO, G. Soil microbial biomass phosphorus and activity of acid phosphatases during decline of soil available phosphorus. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v. 43, p. 1085-1091, 2008.

JOERGENSEN, R.G.; BROOKES, P.C. Ninhydrin-reactive nitrogen measurements of microbial biomass in 0.5 M K₂SO₄ soil extracts. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 22, n. 8, p.1023-1027, 1990.

JOSCHKO, M.; FOX, C.A.; LENTZSCH, P.; KIESEL, J.; HIEROLD, W.; KRÜCK, S.; TIMMER, J. Spatial analysis of earthworm biodiversity at the regional scale. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 112, n. 4, p. 367-380, 2006.

KASCHUK, G.; ALBERTON, O.; HUNGRIA, M. Three decades of soil microbial biomass studies in Brazilian ecosystems: Lessons learned about soil quality and indications for improving sustainability. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 42, n. 1, p.1-13, 2010.

KEENEY, D.R.; NELSON, D.W. Nitrogen inorganic forms. In: PAGE A.L. **Methods of soil analysis**. Madison: American Society of Agronomy, 1982. pt. 2: Chemical and microbiological properties, p. 643-698.

LAVELLE, P. Faunal activities and soil processes: adaptative strategies that determine ecosystem function. **Advances in Ecological Research**, London, v. 27, p. 93-102, 1997.

_____. Ecological challenges for soil science. **Soil Science**, Philadelphia, v. 165, n. 1, p. 73-86, 2000.

LAVELLE, P.; SPAIN, A. **Soil ecology**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2001. 654 p.

LAVELLE, P.; DECAËNS, T.; AUBERT, M.; BAROT, S.; BLOUIN, M.; BUREAU, F.; MARGERIE, P.; MORA, P.; ROSSI, J.P. Soil invertebrates and ecosystem services. **European Journal of Biology**, Paris, v. 42, p. S3-S15, 2006.

- LI, C.H.; MA, B.L.; ZHANG, T.Q. Soil bulk density effects on soil microbial populations and enzyme activities during the growth of maize (*Zea mays* L.) planted in large pots under field exposure. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 82, n. 2, p. 147-154, 2002.
- MÄDER, P.; FLIESSBACH, A.; DUBOIS, D.; GUNST, L.; FRIED, P.; NIGGLI, U. Soil fertility and biodiversity in organic farming. **Science**, Washington, v. 296, n. 5573, p.1694-1697, 2002.
- MERLIM, A.O.; AQUINO, A.M. de; CARDOSO, E.J.B.N. Larvas de Coleoptera em ecossistemas de araucária no Parque Estadual de Campos do Jordão, SP. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, p. 1303-1306, 2006.
- MILLER, S.W.; BUDY, P.; SCHMIDT, J.C. Quantifying macroinvertebrate responses to in-stream habitat restoration: applications of meta-analysis to river restoration. **Restoration Ecology**, Malden, v. 18, n. 1, p. 8-19, 2010.
- MOÇO, M.K.S.; GAMA-RODRIGUES, E.F.; GAMA-RODRIGUES, A.C.; CORREIA, M.E.F. 2005. Characterization of soil fauna in different vegetation covers in the Northern Fluminense Region (RJ). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 29, p. 555-564, 2005.
- MOREIRA, M.; BARETTA, D.; TSAI, S.M.; GOMES-DA-COSTA, S.M.; CARDOSO, E.J.B.N. Biodiversity and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi in *Araucaria angustifolia* forest. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, p. 393-399, 2007.
- MORÓN-RÍOS, A.; RODRÍGUEZ, M.Á.; PÉREZ-CAMACHO, L.; REBOLLO, S. Effects of seasonal grazing and precipitation regime on the soil macroinvertebrates of a Mediterranean old-field. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 46, n. 2, p. 91-96, 2010.
- MOUND, L.A. Thysanoptera: diversity and interactions. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 50, p. 247-269, 2005.
- MURCIA, C. Edge effects in fragmented forests: implications for conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, London, v. 10, p. 58-62, 1995.
- NAHMANI, J.; ROSSI, J.P. Soil macroinvertebrates as indicators of pollution by heavy metals. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 326, n. 3, p. 295-303, 2003.
- NEGRETE-YANKELEVICH, S.; FRAGOSO, C.; NEWTON, A.C.; HEAL, O.W. Successional changes in soil, litter and macroinvertebrate parameters following selective logging in a Mexican Cloud Forest. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 35, n. 2, p. 340-355, 2007.
- ODUM, E.P. **Ecologia**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1983. 434 p.
- PAOLETTI, M.G. The role of earthworms for assessment of sustainability and as bioindicators. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 74, n.1/3, p. 137-155, 1999.

PAULI, N.; BARRIOS, E.; CONACHER, A.J.; OBERTHÜR, T. Soil macrofauna in agricultural landscapes dominated by the Quesungual Slash-and-Mulch Agroforestry System, western Honduras. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 47, n. 2, p.119-132, 2011.

PODGAISKI, L.R.; RODRIGUES, G.G. Leaf-litter decomposition of pioneer plants and detritivore macrofaunal assemblages on coal ash disposals in southern Brazil. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 46, n. 6, p. 394-400, 2010.

RAIJ, B. van; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agronômico, 2001. 285 p.

RIFFALDI, R.; SAVIOZZI, A.; LEVI-MINZI, R.; CARDELLI, R. Biochemical properties of a Mediterranean soil as affected by long-term crop management systems. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 67, n. 1, p. 109-114, 2002.

SALAZAR, S.; SANCHEZ, L.E.; ALVAREZ, J.; VALVERDE, A; GALINDO, P.; IGUAL, J.M.; PEIX, A.; SANTA-REGINA, I. Correlation among soil enzyme activities under different forest system management practices. **Ecological Engineering**, Amsterdam, v. 37, n. 8, p. 1123-1131, 2011.

SALMON, S.; FRIZZERA, L.; CAMARET, S. Linking forest dynamics to richness and assemblage of soil zoological groups and to soil mineralization processes. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 256, n. 9, p. 1612-1623, 2008.

SANTOS, K.; KINOSHITA, L.S. Flora arbustivo-arbórea do fragmento de floresta estacional semidecidual do Ribeirão Cachoeira, município de Campinas, SP. **Acta Botanica Brasilica**, Brasília, v. 17, p. 325-341, 2003.

SARATHCHANDRA, S.U. Nitrification activities and the changes in the population of nitrifying bacteria in soil perfused with two different H-ion concentrations. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 50, n. 1/3, p. 99-111, 1978.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT**: user's guide statistics; version 9.2. Cary, 1999.

SCHINNER, F.; VONMERSI, W. Xylanase-activity, CM-cellulase-activity and invertase activity in soil: an improved method. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 22, n. 4, p. 511-515, 1990.

SILVA, S.R.; SILVA, I.R.; BARROS, N.F.; MENDONÇA, E.S. Effect of compaction on microbial activity and carbon and nitrogen transformations in two oxisols with different mineralogy. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 34, n. 4, p. 1141-1149, 2011.

TABATABAI, M.A.; BREMNER, J.M. Use of p-nitrofenol phosphate for assay of soil phosphatase activity. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 1, p. 301-307, 1969.

_____. Assay of urease activity in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 4, p. 479-487, 1972.

TER BRAAK, C.J.F.; SMILAUER, P. **CANOCO reference manual and user's guide to Canoco for windows**: software for canonical community ordination (Version 4). New York: Microcomputer Power, 1988.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR). Disponível em: <<http://www.unica.com.br>>. Acesso em: 04 abr. 2011.

VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass-C. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 19, n. 6, p. 703-707, 1987.

VELASQUEZ, E.; LAVELLE, P.; ANDRADE, M. GISQ, a multifunctional indicator of soil quality. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 39, n. 12, p. 3066-3080, 2007.

WU, Q-S.; HE, X-H.; ZOU, Y-N.; HE, K-P.; SUN, Y-H.; CAO MI-Q. Spatial distribution of glomalin-related soil protein and its relationships with root mycorrhization, soil aggregates, carbohydrates, activity of protease and β -glucosidase in the rhizosphere of Citrus unshiu. **Soil Biology and Biochemistry**, Kidlington, v. 45, p. 181-183, 2012.

5 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Apesar da sazonalidade ter influenciado os atributos biológicos avaliados (Microrganismos, FMA e Macrofauna) ficou evidente o efeito dos atributos físicos do solo sobre a biota, causado principalmente pela textura e pela densidade do solo (efeito de compactação). É possível observar também a importância dos atributos químicos do solo como do carbono e do nitrogênio. O carbono foi importante para estimular a atividade da biota e para discriminar as áreas em relação à idade de recuperação das áreas ou com a maior cobertura vegetal quanto aos atributos biológicos avaliados. O nitrogênio por sua vez, se mostrou um fator limitante para as áreas em recuperação e, pode, junto com o efeito da compactação, ter retardado o processo de recuperação. Essas limitações mostram a necessidade de um manejo voltado à adubação nitrogenada ou de introdução de leguminosas no plantio das mudas e um melhor tratamento do solo (p. ex. descompactação), anteriormente ao plantio.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Áreas selecionadas para estudo, pertencentes ao ecossistema de Mata Atlântica: Nativa (NT) e em gradiente de recuperação ambiental (R05, R10 e R20)