

RAUL DAMASO SALGADO DEL AGUILA

**DIVERSIDADE BACTERIANA EM SOLOS SOB PLANTIO DE
EUCALIPTO E MATA NATIVA EM IPABA, REGIÃO DE BELO
ORIENTE, MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

A283d

Aguila, Raul Damaso Salgado del, 1966-

Diversidade bacteriana em solos sob plantio de eucalipto e mata nativa em Ipaba, região de Belo Oriente, Minas Gerais / Raul Damaso Salgado del Aguila. – Viçosa, MG, 2009. xi, 64f. : il. (algumas colunas) ; 29cm.

Orientador: Arnaldo Chaer Borges.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 60-64.

1. Micro-organismos do solo. 2. Ecologia microbiana.
3. Bactérias – Identificação. 4. Solo – Uso. 5. Eletroforese.
de gel. 6. Eucalipto. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

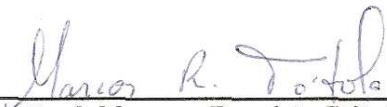
CDD 22 ed. 631.46

RAUL DAMASO SALGADO DEL AGUILA

**DIVERSIDADE BACTERIANA EM SOLOS SOB PLANTIO DE
EUCALIPTO E MATA NATIVA EM IPABA, REGIÃO DE BELO
ORIENTE, MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 18 de fevereiro de 2009,



Prof. Marcos Rogério Tótola
(Coorientador)



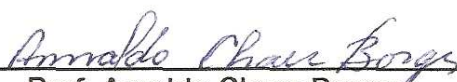
Prof. Maurício Dutra Costa
(Coorientador)



Prof. Júlio César Lima Neves



Prof. Antônio Galvão do Nascimento



Prof. Arnaldo Chaer Borges
(Orientador)

À minha mãe, Zélia, que tenta há 42 anos me fazer um homem melhor.

Às minhas tias, Aurélia e Emer, que me apoiaram incondicionalmente nesta empreitada.

Aos meus filhos, Caio, Raul Leonardo, Nicolas e Camila, a quem amo tanto.

À Elisa, esposa e amiga, que com o seu amor me deu as condições práticas para superar as dificuldades

Amo vocês.

Muito obrigado

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pela família que me deu.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia Agrícola, pela oportunidade de realização do curso.

Ao CEFET de Química, na pessoa de seu Diretor Geral, prof. Luiz Edmundo Vargas de Aguiar, que possibilitou este curso.

Ao Administrador Sr. Jeferson, Diretor do CEFET – Unidade Maracanã, pelo precioso apoio dado.

À prof^a Célia Alencar de Moraes, coordenadora do curso de pós-graduação em Microbiologia Agrícola da UFV, pela orientação segura na fase de instrução do processo de seleção e pelo interesse para com o êxito em meu processo de qualificação.

A todos os professores, em especial aos professores Maurício Dutra Costa, Marcos Rogério Tótola, Júlio César Lima Neves e Antônio Galvão do Nascimento, que apoiaram e fortaleceram meu aprendizado.

Aos técnicos Pablo e Paulo Leandro, pela ajuda no laboratório de aulas da graduação.

Aos servidores Danilo, Evandro, Antonio e Paulo, por todo suporte dado.

A todos os amigos dos laboratórios do Departamento de Microbiologia, particularmente aos do Laboratório de Ecologia Microbiana, Maurício Pontes, Helson Mário, Isabella, Alexander, Paulo Elpídio e Julio Delvaux, sem os quais

a vida na UFV teria sido mais difícil, registro que contribuíram enormemente para meu desenvolvimento.

Ao prof. Arnaldo Chaer Borges, orientador que com sabedoria profissional e de vida conduziu esta primeira etapa do meu projeto de qualificação formal em Microbiologia.

BIOGRAFIA

RAUL DAMASO SALGADO DEL AGUILA, filho de Zélia Costa Salgado e de Raul Damaso del Aguila, nasceu na cidade do Rio de Janeiro, em 30 de maio de 1966.

Cursou a Faculdade de Biologia na Universidade Gama Filho, graduando-se em 1989. No mesmo ano mudou-se para Manaus-AM, onde começou estagiando no Laboratório de Micologia Médica sob a orientação da Dr^a Aurélia Lopes Castrillón.

Em 1992, ingressou na carreira de professor de Biologia do Centro Federal de Educação Tecnológica do Amazonas (CEFET-AM) por concurso público.

No período de 1994 a 1996, cursou a Especialização em Microbiologia na Pontifícia Universidade Católica de Belo Horizonte, Minas Gerais.

Foi transferido em 1999 para o então Centro Federal de Educação Tecnológica de Química de Nilópolis (CEFETEQ) no Estado do Rio de Janeiro, atualmente Instituto Federal de Educação do Rio de Janeiro (IFE-RJ).

Em 2006, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, concluindo-o em abril de 2010.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Diversidade microbiana em solos	1
1.2. Plantio de eucalipto e diversidade microbiana	3
1.3. Técnicas moleculares e grupos microbianos	4
1.4. Índices de diversidade.....	7
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	8
2.1. Área de estudo e amostragem	8
2.2. Análises físicas e químicas	9
2.3. Análises moleculares	10
2.3.1. Extração de DNA genômico total de micro-organismos do solo	10
2.3.2. PCR de grupos específicos.....	10
2.3.3. Eletroforese em gel com gradiente desnaturante.....	10
2.3.4. Digitalização e análise das Imagens dos geis.....	14
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
3.1. Análises físicas e químicas	15
3.2. Extração do DNA	16
3.3. PCR, DGGE, Análise de Similaridade e Índice de Diversidade para Eubacteria.....	18

	Página
3.4. PCR, DGGE, análise de similaridade e índice de diversidade para α -Proteobacteria	26
3.5. PCR, DGGE, análise de similaridade e índice de diversidade para β -Proteobacteria	31
3.6. PCR, DGGE, análise de similaridade e índice de diversidade para γ -Proteobacteria	40
3.7. PCR, DGGEa análise de similaridade e índice de diversidade para Actinobacteria e Firmicutes.....	46
4. CONCLUSÕES	59
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

RESUMO

del AGUILA, Raul Damaso Salgado, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2009. **Diversidade bacteriana em solos sob plantio de eucalipto e mata nativa em Ipaba, região de Belo Oriente, Minas Gerais.** Orientador: Arnaldo Chaer Borges. Coorientadores: Marcos Rogério Tótola e Maurício Dutra Costa.

Este trabalho teve como objetivo avaliar e comparar a diversidade bacteriana de solos sob plantio de eucalipto com a encontrada sob solos de mata nativa da região. O estudo abrangeu seis áreas da Empresa Celulose Nipo-Brasileira, sendo três áreas destinadas ao plantio de eucalipto e três áreas de mata nativa conservada, em dois projetos da empresa, o da Lagoa Cristal e o da Lagoa do Jacinto, em solos de duas classes, Latossolo e Neossolo flúvico. A amostragem foi realizada nas seis áreas em março de 2008 para a realização das análises de diversidade de bactérias pertencentes aos filos α -Proteobacteria, β -Proteobacteria, γ -Proteobacteria, Actinobacteria e Firmicutes. A eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), foi a técnica de escolha, sendo a análise da diversidade genética, com uso das imagens dos geis, realizada com o *software* GelComparII® (Applied Maths, Inc. – Texas USA). Para os cálculos do índice de diversidade de Shannon-Weaver foi utilizado o *software* Diversidade de Espécies v-2.0 (W. C. Rodrigues – Lizaro Soft – Entomologistas do Brasil – Brasil). No estudo da comunidade de bactérias totais (Eubacteria) e de β -Proteobacteria, γ -Proteobacteria e Actinobacteria, o

maior índice de diversidade correspondeu a solos sob mata nativa. Para α -Proteobacteria e Firmicutes os maiores índices foram os encontrados para solos sob eucalipto. O filo α -Proteobacteria foi o caracterizado como o dominante em Latossolo e Neossolo, tanto nos sob eucalipto como nos sob mata nativa. A diversidade em Firmicutes e γ -Proteobacteria foi também expressiva, porém em Actinobacteria e β -Proteobacteria a diversidade foi menor em todas as áreas em estudo. As médias dos índices de diversidade de filios considerando as classes de solo foram maiores em Latossolo, excetuando-se a de Firmicutes, em que a maior diversidade foi em solo sob eucalipto. O maior índice de diversidade de Eubacteria em solos sob mata dos que nos solos sob eucalipto corroborou a afirmativa de que a cobertura vegetal determina alterações na diversidade da comunidade microbiana.

ABSTRACT

del AGUILA, Raul Damaso Salgado, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2009. **Bacterial diversity of soil under eucalyptus plantation and native forest of Ipaba at the region of Belo Oriente, state of Minas Gerais.** Adviser: Arnaldo Chaer Borges. Co-advisers: Marcos Rogério Tótola and Maurício Dutra Costa.

The objective of this work was to compare the bacterial diversity found in soils under eucalyptus with those found under native forest. Six areas belonging to Celulose Nipo-Brasileira – CENIBRA were studied; three of them were eucalyptus plantations and three were preserved native forests. They were located in two different projects of the company, the Crystal Lake and the Jacinto Lake, bearing two classes of soils, Latosol and Fluvic Neosol. Sampling was performed in March 2008 and bacterial diversity was assessed for the α -Proteobacteria, β -Proteobacteria, γ -Proteobacteria, Actinobacteria and Firmicutes phyla. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) was carried out for genetic diversity analysis and the resolved gel images were analyzed with the GELCOMPARII[®] software (Applied Maths, Inc – Texas USA). Shannon Weaver diversity indexes were calculated by means of the software Diversity of Species v. 2.0 (W.C Rodrigues – Lizaro Soft - Entomologists of Brazil – Brazil) The highest diversity indexes for total bacteria (Eubacteria), β -Proteobacteria, γ -Proteobacteria, and Actinobacteria was found in soils of native forests. Soils under eucalyptus forests displayed the highest diversity index for α -

Proteobacteria and Firmicutes. The phylum α -Proteobacteria was the dominant one in Latosol and Neosol, both under eucalyptus and native forests. Diversity among Firmicutes and γ -Proteobacteria was also expressive; however, diversity of Actinobacteria and β -Proteobacteria was lowest in all areas studied. Diversity indexes averages among all phyla, when classes of soils were compared, were higher for Latosols, except for those of Firmicutes. The highest Eubacteria diversity index in soils under native forests as compared to those displayed under eucalyptus corroborates the hypothesis that plant coverage determines shifts in the microbial communities diversity.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Diversidade microbiana em solos

Os micro-organismos encontrados no solo desempenham várias funções que têm efeito positivo sobre a produtividade primária por atuarem diretamente na reciclagem de energia e nutrientes, deixando-os disponíveis para vegetais e animais (LOREAU, 2001; HOFMAN *et al.*, 2003). O solo como um dos maiores reservatórios de bactérias na Terra tem uma comunidade bacteriana em 1 grama estimada de 1.10^3 a $8,3.10^6$ espécimes de bactérias (TORSVIK *et al.*, 2002; SCHLOSS; HANDELSMAN, 2006), e a imensa maioria ainda não foi caracterizada. Os processos que ocorrem no solo são influenciados pela estrutura, atividade e estabilidade da comunidade microbiana (WHITMAN *et al.*, 1998; DUNBAR *et al.*, 1999; McCAIG *et al.*, 2001; COLEMAN; WHITMAN, 2005).

A alta diversidade da comunidade microbiana do solo propicia uma alta redundância funcional, a qual está diretamente relacionada com a resiliência do solo, ou seja, sua capacidade de retornar a um estado prévio após sofrer determinado estresse (van BRUGGEN; SEMENOV, 2000). Desta maneira, os micro-organismos do solo são uma medida importante do uso sustentável da terra por serem sensíveis às mudanças nas propriedades físicas e químicas deste solo (WOLTERS; JÖRGENSEN, 1991; BECK *et al.*, 1995). Países da União Europeia têm articulado programas que justificam a necessidade de se

monitorar a diversidade microbiana como indicadora da qualidade do solo e também para se prever as possíveis mudanças funcionais, que podem repercutir tanto na qualidade do meio ambiente, agrícola ou natural, como também na saúde pública (PLATEFORME GENOSOL, 2008).

Ações antrópicas causam distúrbios na estabilidade do solo nos três aspectos: físico, químico e biológico. Esses distúrbios resultam em alterações na composição da matéria orgânica, na disponibilidade de nutrientes e na estrutura da comunidade microbiana, resultando na diminuição da diversidade microbiana e conseqüentemente na qualidade do solo (HENDRIX *et al.*, 2001).

A estrutura e o tamanho da comunidade microbiana são, portanto, muito dinâmicas e influenciadas pelos fatores bióticos e abióticos causados pelo homem ou por meios naturais. Em solo de uso agroflorestral na Índia, a maior densidade populacional de micro-organismos se encontra na camada de 0 a 10 cm e ocorrendo na estação da primavera, entretanto quando entra a estação chuvosa, a população microbiana passa a se concentrar na camada de 10 a 20 cm, sendo intensamente influenciada pela ação das águas (TANGJANG, 2009). Mudança por longos períodos na temperatura do solo resultante do aquecimento da atmosfera altera processos e propriedades do solo e resultam na diminuição da biomassa microbiana e no uso da variedade de fontes de carbono em florestas de Massachussets – USA (FREY, 2008). A comparação da composição da comunidade microbiana em solos com diferentes espécies vegetais realizada nas florestas de Bornéu mostrou diferenças entre si, de acordo com a espécie vegetal dominante no solo (USHIO, 2008). Comparação entre solos agrícolas com uma floresta de 150 anos na Georgia – USA indicou diferença significativa na estrutura e composição da comunidade bacteriana. Entre os solos agrícolas estudados o efeito da fertilização sobre a comunidade bacteriana foi maior do que o efeito do tipo de uso da terra e da estação climática (JANGID, 2008).

Uma das mais importantes atividades humanas que depende do solo e exercem alto impacto nele é a agricultura. O contínuo aumento do uso do solo para agricultura tem levado ao aumento dos processos de erosão, perda da matéria orgânica do solo e mudanças na comunidade bacteriana do solo (MATSON *et al.*, 1997). Em solo sob floresta o distúrbio mais comum é a ação do vento sobre as árvores, derrubando-as ou quebrando-as (WRIGHT;

COLEMAN, 2002). É comum a comparação de solos de áreas sob cultivo com solos de florestas adjacentes para se avaliar o impacto do manejo sobre a comunidade microbiana.

Em estudo comparativo entre solos sob florestas jovens e velhas, com solos sob cultivo no sudeste da Geórgia - USA, foi detectada diferença significativa na composição das comunidades microbianas dos solos, sendo a maior diversidade em solos sob cultivo (UPCHURCH *et al.*, 2008). Os dois solos apresentaram grande número de raras UTOs, entretanto nos sob florestas foram encontradas poucas UTOs abundantes. Para explicar a maior diversidade em solos sob cultivo os autores consideraram algumas hipóteses, a exemplo de: variações sazonais da comunidade de vegetais podem ter criado uma comunidade bacteriana mais dinâmica e, portanto mais diversa; a área de cultivo encontrava-se mais exposta do que a de florestas e permitiu o transporte de bactérias pelo vento ou por animais; o manejo corrompeu a comunidade existente e permitiu a migração bem sucedida, enquanto nas florestas a ocorrência de raros distúrbios permitiu o desenvolvimento de grandes populações de bactérias bem adaptadas. Este estudo contrasta com estudos anteriores que demonstraram a diminuição da diversidade da comunidade bacteriana com o manejo da terra (OVREAS; TORSVIK, 1998; UPCHURCH, 2008).

1.2. Plantio de eucalipto e diversidade microbiana

O plantio comercial de eucalipto no Brasil apresenta grande importância econômica e pode-se dizer até ambiental. Em 2007, o Brasil alcançou a faixa dos 3 milhões de hectares (ABRAF, 2008). O estado de Minas Gerais é o terceiro maior reflorestador com a marca de 180 mil hectares, compreendendo 0,3% da área total do estado e empregando mais de 6 mil pessoas direta ou indiretamente.

Uma grande utilização comercial do eucalipto plantado é a fabricação de celulose. A consolidação e a expansão do moderno complexo industrial de produção de celulose de fibra curta concorrem para assegurar a liderança mundial do País na produção de celulose a partir desta árvore. O Brasil é o sexto produtor mundial de celulose e o primeiro na sua produção a partir de

árvores de eucalipto. Esta eficiência se deve ao alto rendimento alcançado pela plantação de eucalipto com rotação de sete anos e produção de 41 m³ ha/ano. A alta produtividade das florestas plantadas de eucalipto se deve a fatores como qualidade do solo e clima, pesquisa e desenvolvimento de tecnologias nas áreas de genética, biotecnologia, matéria prima de alta qualidade, planejamento socioambiental, manejo florestal e rotação de áreas plantadas.

O setor de produção de celulose e papel no Brasil apresenta números expressivos com exportações na casa de US\$ 5.8 bilhões e saldo comercial de US\$ 4.1 bilhões (16% do saldo da Balança Comercial do País) gerando 114 mil empregos diretos e 570 mil indiretos (BRACELPA, 2008).

Em termos ambientais, as florestas plantadas de eucalipto também apresentam grandes contribuições tais como: não competem com a agricultura tradicional, restauração de áreas degradadas, conservação do solo, proteção da biodiversidade, proteção dos recursos hídricos, participação no sequestro de CO₂, alívio na pressão sobre as florestas naturais quanto ao seu desmatamento (BRACELPA, 2008).

A monocultura do eucalipto significa uma simplificação do ecossistema natural levando a diminuição da diversidade microbiana e podendo afetar a qualidade do solo. No entanto, pesquisa realizada em solos de mata nativa e solos sob plantio de eucalipto no estado de São Paulo acusou uma maior diversidade microbiana no solo cultivado (SILVEIRA *et al.*, 2006).

1.3. Técnicas moleculares e grupos microbianos

As técnicas de cultivo *in vitro* alcançam somente uma pequena fração de micro-organismos presentes no solo (AMANN *et al.*, 1995; COUTINHO *et al.*, 1999; NUSSLEIN; TIEDJE, 1999), além de não demonstrarem as relações de interdependências entre as populações que não são cultiváveis, não representando assim a realidade do ecossistema, sendo necessário o uso de técnicas moleculares para se avaliar a comunidade microbiana.

Para se estudar a diversidade da comunidade microbiana em seu habitat, pode-se utilizar técnicas com base nas impressões genéticas – *genetic fingerprint techniques*, que partem da extração do DNA total do solo e amplificação de sequências-alvo do gene 16S rDNA da comunidade bacteriana

que tem se mostrado bastante importante em ecologia microbiana pois são universalmente distribuídos entre os diferentes grupos de seres vivos sendo a molécula com o maior grau de conservação existente pela reação em cadeia da polimerase – PCR (MUYZER, 1999), possibilitando o dimensionamento mais real da microbiota do solo ao incluir também os organismos ainda não cultiváveis, permitindo assim o estudo da diversidade sem a necessidade de cultivo *in vitro* (EMBLEY, 1997; HUGENHOLTZ, 1998; MACRAE, 2000; RAPPÉ, 2003; JANSSEN, 2006). Utilizam-se iniciadores para os principais grupos de micro-organismos comumente encontrados no solo, seguida da Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante – DGGE – que se baseia na mobilidade eletroforética diferencial quanto à susceptibilidade da molécula de DNA á desnaturação parcial promovida por agentes desnaturantes e discrimina produtos de PCR de acordo com seu teor de guanina mais citosina (G+C) para as análises filogenéticas dos membros da comunidade (MUYZER *et al.*, 1993; ROSADO *et al.*, 1999).

O uso do 16S rDNA (ácido nucléico da sub-unidade ribossomal 16S) tem se mostrado bastante importante em ecologia microbiana pois são universalmente distribuídos entre os diferentes grupos de seres vivos sendo a molécula com o maior grau de conservação existente, e também por permitir o estudo da diversidade sem a necessidade de cultivo dos micro-organismos (EMBLEY, 1997; HUGENHOLTZ, 1998; MACRAE, 2000; RAPPÉ, 2003; JANSSEN, 2006).

A técnica de DGGE permite analisar produtos de PCR de acordo com seu teor G+C determinando a diversidade genética de comunidades microbianas naturais e permitindo posteriormente a análise filogenética dos membros da comunidade (ROSADO *et al.*, 1999). A DGGE utiliza geis de poliacrilamida contendo um gradiente linear de desnaturantes (ureia e formamida). Moléculas de DNA com o mesmo tamanho, mas com teores distintos de G+C formam padrões de bandas apresentando comportamento eletroforético diferente quando expostas ao gradiente de agentes desnaturantes, com taxas de migração diferentes nos geis. DNA. Esta técnica se mostra sensível as mudanças na comunidade microbiana servindo como ferramenta para avaliação desta comunidade (ROSADO *et al.*, 2000; SMITH *et al.*, 2001; KIRK *et al.*,

2004; ASAKAWA; KIMURA, 2008; BRONS; van ELSAS, 2008; DONG *et al.*, 2008; JACKSON *et al.*, 2008).

Como várias espécies bacterianas podem possuir múltiplas cópias do 16S rDNA que podem ser discriminadas pela técnica de DGGE resultando em várias bandas para uma mesma espécie (NUBEL *et al.*, 1996) nos referimos às diferentes bandas no gel de DGGE como unidades taxonômicas operacionais (UTOs).

Com o desenvolvimento das técnicas moleculares e a consequente evolução da classificação bacteriana alguns grupos tem se destacado pela sua presença e importância no solo. Em pesquisa baseada com clones de 16S rRNA e dos genes de 16S rRNA depositados em bancos de dados, os grupos α -Proteobacteria, α -Proteobacteria, γ -Proteobacteria e Actinobacteria foram os mais numerosos em termos de proporção dos clones estudados e também como os grupos que tiveram maior número de gêneros descritos (Janssen, 2006). No estudo de Silveira (2006) foram observados como grupos dominantes: Acidobacteria, Actinobacteria e Proteobacteria tanto em solo de mata quanto em solo de cultivo de eucalipto. Em comparação feita entre solos de mata e solos sob cultivo com tomate e feijão em Guaira no estado de São Paulo os grupos dominantes foram Proteobacteria, Acidobacteria e Firmicutes (Pereira, 2006). Com o uso da técnica de pirosequenciamento em solos dentro de um grande transecto no hemisfério oeste, os grupos mais abundantes foram Bacteroidetes, β -Proteobacteria e α -Proteobacteria (ROESCH, 2007). Na América do Norte, estudo com 71 amostras de solo de ecossistemas distintos para determinar a existência de relação entre propriedades do solo e abundância relativa de eis dos filós dominantes do domínio Bactéria, Acidobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, α -Proteobacteria e β -Proteobacteria, conclui que a taxa líquida de mineralização do carbono foi o melhor preditor da abundância em nível de filo, entre as propriedades do solo medidas (FIERER *et al.*, 2007).

A diversidade bacteriana nas amostras de solos sob plantio de eucalipto ou mata nativa em Ipaba, região de Belo Oriente, Minas Gerais, ainda não foi avaliada para populações dos filós cuja ocorrência já foi relatada em

outras regiões, a exemplo de: α -Proteobacteria, β -Proteobacteria, γ -Proteobacteria, Actinobacteria e Firmicutes.

1.4. Índices de diversidade

A diversidade baseia-se em função de dois componentes igualmente importantes, a riqueza de espécies (número total de espécies), e a equitabilidade (distribuição dos indivíduos dentro de cada população).

Quando duas comunidades apresentam o mesmo índice de diversidade ainda assim elas podem ser bem diferentes, pois uma delas pode ter uma alta riqueza e baixa equitabilidade e a outra uma baixa riqueza e alta equitabilidade, portanto é importante considerar estas três características na comparação: riqueza, equitabilidade e diversidade (TÓTOLA; CHAER, 2002).

O índice proposto por Shannon (1948) possui uma vantagem em relação aos outros índices, pois é apropriado para amostras aleatórias de espécies de uma comunidade ou subcomunidade de interesse, e é estimado através da seguinte equação:

$$H' = - \sum p_i \log p_i$$

em que p_i é a proporção da espécie em relação ao número total de espécimes encontrados nos levantamentos realizados.

O conhecimento e dimensionamento da diversidade bacteriana do solo, funcional e taxonomicamente, estão contribuindo para o estabelecimento de um sistema de referência e interpretações na escala do tempo dos impactos das intervenções no ambiente.

No presente estudo objetivou-se avaliar a diversidade em filos do domínio Bactéria, nos solos sob plantações de eucalipto pertencentes à Celulose Nipo-Brasileira (CENIBRA) no município de Ipaba, Região do Vale do Rio Doce em Minas Gerais a fim de testar a hipótese de que a diversidade bacteriana em solos sob cultivo de eucalipto é menor do que a dos mesmos solos sob mata nativa.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Área de estudo e amostragem

As amostras foram coletadas no Município de Ipaba, Região do Vale do Rio Doce em Minas Gerais. As áreas pertencem à CENIBRA (Celulose Nipo-Brasileira) sendo parte da área destinada ao plantio de eucalipto para obtenção de celulose e parte conservada como mata atlântica. Dois projetos da CENIBRA foram escolhidos, Lagoa Cristal e Lagoa do Jacinto (Tabela 1). Entenda-se como “projeto” neste caso determinada área delimitada onde se encontra áreas de reserva e áreas exploradas com o plantio de eucalipto.

Tabela 1 – Denominação dada às áreas pertencentes à empresa Celulose Nipo-Brasileira (CENIBRA) no município de Ipaba, MG, nos projetos Lagoa Cristal e Lagoa do Jacinto, com as respectivas coberturas vegetais e classes de solo

Áreas	Projeto	Uso do Solo ¹	Classe de Solo	Latitude	Longitude
1	Lagoa Cristal	Eucalipto	Latossolo	-19° 40' 06.51"	-42° 28' 52.06"
2	Lagoa Cristal	Eucalipto	Neossolo flúvico	-19° 39' 54.01"	-42° 29' 00.63"
3	Lagoa Cristal	Reserva Legal	Neossolo flúvico	-19°40' 06.02"	-42° 29' 37.94"
4	Lagoa Cristal	Reserva Legal	Latossolo	-19°40' 12.26"	-42° 28' 53.98"
5	Lagoa do Jacinto	Pres. Permanente	Latossolo	-19° 34' 09.77"	-42° 27' 21.35"
6	Lagoa do Jacinto	Eucalipto	Latossolo	-19° 34' 07.24"	-42° 29' 19.13"

¹ Na área 2 as árvores de eucalipto haviam sido colhidas há seis meses, enquanto as das áreas 1 e 6 se encontravam com cerca de dois anos de desenvolvimento.

No projeto Lagoa Cristal, a amostragem foi feita em quatro áreas distintas e no Projeto Lagoa do Jacinto em duas áreas. Para as análises moleculares foram coletadas aleatoriamente ao longo de uma linha oblíqua em cada área, três grupos de dez amostras simples do solo na profundidade de 0 –10 cm. Cada um dos três grupos de dez amostras foi destorroado e passado através de peneira com malha de 2 mm para compor uma amostra composta, ao final dos três grupos foram obtidas três amostras compostas de cada uma das áreas sob estudo. Uma fração de 5 gramas de cada amostra composta foi misturada com as outras duas frações para compor a amostra do solo da área sob estudo, utilizada nas análises moleculares de cada um dos projetos.

As áreas com plantio de eucalipto foram manejadas da seguinte maneira: tipo de preparo intermediário com subsolagem na linha de plantio e coveamento mecanizado ou manual; espaçamento de 3,00 x 3,33 m; adubação no plantio de 6-30-6 com calcário e fosfato. Foram usados clones de *Eucalyptus grandis*, *E. Urograndis* e Híb. Rio Claro (Evolução do Sistema de manejo de plantio de eucalipto em áreas da CENIBRA, 2008)

A coleta foi realizada no mês de março quando o clima apresentou as seguintes características: temperatura média do ar de 24,2 °C com mínima de 20,6 °C e máxima de 29,1 °C; umidade relativa média do ar de 78,7%; velocidade média do vento de 2,5 m/s; precipitação pluviométrica de 148,1 mm; número de dias com chuva no mês igual a 13; excesso hídrico de 36 mm; evapotranspiração potencial de 3,5 mm (Relatório Climático – CENIBRA, 2008).

2.2. Análises físicas e químicas

De todas as amostras de solo foram feitas análises granulométricas para se determinar a classe textural do solo.

Para a caracterização química das amostras foram feitas as seguintes análises: pH em água, KCl e CaCl₂ com a relação 1:2,5; quantificação de P, Na, K, e Zn, Mn e Cu (Extrator Mehlich I); quantificação de H + Al (extrator acetato de cálcio 0,5 mol/L – pH 7,0); soma de bases trocáveis; capacidade de troca catiônica efetiva e capacidade de troca catiônica a pH 7,0; índice de saturação de bases; índice de saturação de alumínio; índice de saturação de

sódio; fósforo remanescente e matéria orgânica sendo igual ao produto do carbono orgânico pelo valor 1,724 – Walkley-Black.

2.3. Análises moleculares

2.3.1. Extração de DNA genômico total de micro-organismos do solo

De cada amostra, o DNA genômico total dos micro-organismos presentes na amostra de solo de cada área foi extraído com uso do Kit MoBio PowerSoil™ DNA Isolation (cat. 12888-100), de acordo com as recomendações do fabricante. Os extratos foram analisados em gel de agarose 0,8%, em tampão TAE 1x e brometo de etídio (10 µg/mL). A eletroforese foi realizada em um sistema horizontal a 40 V cm⁻¹ durante 30 min (Bio-Rad®, USA).

2.3.2. PCR de grupos específicos

Cada amostra de DNA genômico total de micro-organismos dos solos foi submetida como molde às reações de amplificação do 16S rDNA por PCR, com uso do aparelho Eppendorf® Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg – Germany). Em todas as reações foi utilizado um controle negativo, sem o DNA molde, e a verificação de todos os produtos de amplificação foi feita por eletroforese, aplicando-se 5 µL de cada reação acrescidos de marcador de tamanho (100 bp) em gel de agarose 1,2%, em tampão TAE (40 mM tris-acetato e 1 mM EDTA) e brometo de etídio (2 µL/100 mL). A eletroforese foi realizada em um sistema horizontal a 40 V cm⁻¹ durante 30 min. (Bio-Rad®, USA).

As amplificações dos fragmentos de 16S rDNA foram feitas de acordo com o detalhamento descrito nas Tabelas 2 e 3, com uso dos iniciadores e de acordo com as referências citadas na Tabela 4.

2.3.3. Eletroforese em gel com gradiente desnaturante

A análise dos fragmentos do gene 16S rDNA amplificados por eletroforese em gel com gradiente desnaturante foi feita com o equipamento “DCode™ Universal Mutation Detection System” da Bio-Rad® – Califórnia USA. Uma alíquota das reações de amplificação (20 µL) foi aplicada em gel de

Tabela 2 – Detalhamento da composição de reagentes para as PCR e PCR-Nested para grupos específicos de α -Proteobacteria, β -Proteobacteria, γ -Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria

Reagentes	α	β -Proteobacteria	γ	Firmicutes	Actinobacteria	Eubacteria PCR-Nested
Água	q.s.p. 25 μ L ¹	q.s.p. 25 μ L	q.s.p. 25 μ L	q.s.p. 25 μ L	q.s.p. 25 μ L	q.s.p. 25 μ L
Tampão Green GoTaq® (Promega) 5x	5,0 μ L	5,0 μ L	5,0 μ L	5,0 μ L	5,0 μ L	5,0 μ L
dNTPs	200 μ M	200 μ M	200 μ M	160 μ M	200 μ M	200 μ M
MgCl ₂	3,75 mM	3,75 mM	1,5 mM	3,0 mM	2,5 mM	3,75 mM
Primer 1	0,2 μ M	0,2 μ M	0,2 μ M	0,1 μ M	0,1 μ M	0,2 μ M
Primer 2	0,2 μ M	0,2 μ M	0,2 μ M	0,1 μ M	0,1 μ M	0,2 μ M
Formamida	2 % (v/v)	2 % (v/v)	X	X	2 % (v/v)	2 % (v/v)
BSA (Invitrogen®)	0,1 μ g/mL	0,1 μ g / mL	X	0,1 μ g / mL	0,1 μ g / mL	0,1 μ g/mL
Taq DNA polimerase (Promega®)	5 U/50 μ L	5 U/50 μ L	2,5 U/50 μ L	1,25 U/50 μ L	1,25 U/50 μ L	5 U/50 μ L
DNA	20 ng (2 μ L)	20 ng (2 μ L)	20 ng (2 μ L)	20 ng (2 μ L)	20 ng (2 μ L)	20 ng (2 μ L)

¹ Corresponde às concentrações finais dos reagentes.

Tabela 3 – Condições das PCRs realizadas em termociclador Eppendorf® Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg – Germany) para amplificar os fragmentos de 16S rDNA para análises de Eubacteria e PCR-Nested para grupos específicos de α -Proteobacteria, β -Proteobacteria, γ -Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria

Ciclos	Eubacteria	Proteobacteria			Actinobacteria	Firmicutes	PCR-Nested
		α	β	γ			
Desnaturação							
1x	94 °C/5'	94 °C/5'	94 °C/5'	94 °C/4'	94 °C/5' ²	95 °C/3'	94 °C/5'
Amplificação							
Ciclos	35x	25x	25x	35x	35x	30x	20x
Desnaturação	94 °C/1'	94 °C/1'	94 °C/1'	94 °C/1'	94 °C/1'	94 °C/30"	94 °C/1'
Anelamento	55 - 65 °C/1' ¹	56 °C/1'	61 °C/1'	55 °C/45"	63 °C/1'	57 °C/30"	53 °C/1'
Elongamento	72 °C/2'	72 °C/2'	72 °C/2'	72 °C/90"	72 °C/2'	72 °C/90"	72 °C/2'
Elongamento Final							
1x	72 °C/10'	72 °C/10'	72 °C/10'	72 °C/15'	72 °C/10'	72 °C/7'	72 °C/10'
Resfriamento a 4 °C							

¹ Início a 65 °C, diminuindo 2 °C a cada segundo ciclo até atingir 55 °C, continuando assim por mais 25 ciclos.

² HotStart – Adição da Taq Polimerase após a primeira desnaturação e na temperatura de 80 °C, para prevenir anelamentos inespecíficos dos iniciadores em regiões não desejadas do DNA.

Tabela 4 – Sequência dos iniciadores usados para amplificar fragmentos de genes 16S rDNA nas PCRs e referências utilizadas

Iniciadores	Posição de 16S rDNA ¹	Sequência (5'-3')	Referência
F203α	α-Proteobacteria (174-203)	CCG CAT AGC CCC TAC GGG GGA AAG ATT TAT	GOMES <i>et al.</i> (2001)
F948β	β-Proteobacteria (931-948)	CGC ACA AGC GGT GGA TGA	GOMES <i>et al.</i> (2001)
F243H GC	Actinobacteria (226-243)	GGA TGA GCC CGC GGC CTA CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G	HEUER <i>et al.</i> (1997)
R1492	Bacteria (1492-1513)	TAC GG(C/T) TAC CTT GTT ACG ACT T	GELSOMINO <i>et al.</i> (2006)
F984GC	Bacteria (968-984)	CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC	HEUER <i>et al.</i> (1997)
R1378	Bacteria (1378-1401)	CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG	HEUER <i>et al.</i> (1997)
BLS342F	Firmicutes (342-402)	CAG CAG TAG GGA ATC TTC	BLACKWOOD <i>et al.</i> (2005)
1392R	Bacteria (1392-1406)	ACG GGC GGT GTG TAC A	BLACKWOOD <i>et al.</i> (2005)
fD2	γ-Proteobacteria (18-47)	AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG	WEISBURG <i>et al.</i> (1991)
rP1	Bacteria (1512-1406)	ACG GTT ACC TTG TTA CGA CTT	WEISBURG <i>et al.</i> (1991)

¹ Posição no genoma de *Escherichia coli* (BROSIUS *et al.*, 1981).

poliacrilamida vertical (acrilamida-bisacrilamida 37,5/1) a 6%, com gradiente desnaturante ureia/formamida variando entre 40 a 58% (MUYZER *et al.*, 1993) imerso em tampão TAE 1x.

A eletroforese ocorreu em temperatura de 60 °C, 50 v durante 16 horas, seguindo-se a coloração do gel com SYBR Green® I (10 µL) diluído em 100 mL do tampão TAE 1x por 20 min.

2.3.4. Digitalização e análise das Imagens dos geis

As imagens dos geis sob luz UV foram digitalizadas em equipamento Eagle-Eye II Still Video System® (Stratagene – Califórnia USA), e salva em arquivo eletrônico do tipo “.tiff”.

A análise da diversidade genética com uso das imagens dos geis foi realizada com o software GelComparII® (Applied Maths, Inc – Texas USA). Os ajustes básicos foram: largura da raia: 19 pts.; altura mínima da banda: 5%; correção de background: 15% (Actinobacteria), 16% (α -Proteobacteria e β -Proteobacteria) e 17% (γ -Proteobacteria, Firmicutes e Eubacteria).

Os índices de diversidade foram calculados com o uso do Software Diversidade de Espécies v-2.0 (W. C. Rodrigues – Lizaro Soft – Entomologistas do Brasil – Brasil). Para o cálculo do índice de Shannon-Wiener usou-se a seguinte equação: $H' = -\sum p_i \log p_i$ (Shanon, 1948; Rodrigues, 2005).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análises físicas e químicas

As análises físicas das seis mostras de solo determinaram que elas apresentam características predominantes de solo rico em argila e com as proporções de seus componentes homogêneas. A amostra 3 do Neossolo flúvico, usado como reserva legal (Tabela 1), apresentou a maior quantidade de argila e a menor de areia. Com esta proporção de areia e argila esse solo é mais impermeável a água e apresenta maior capacidade de retenção (Tabela 5).

Tabela 5 – Caracterização física das seis amostras de solo coletadas em áreas pertencentes à CENIBRA (Celulose Nipo-Brasileira) no Município de Ipaba, Região do Vale do Rio Doce em Minas Gerais

Amostra	Areia Grossa	Areia Fina	Silte	Argila	Classe textural
dag/kg					
1	22,67	14,00	4,33	59,00	Argila; Muito argilosa; argila
2	49,00	9,33	11,67	30,00	Argila; 2 Franco-argilo-arenosa
3	7,33	7,00	25,33	60,33	Argila; 2 Muito Argilosa
4	22,67	13,33	6,33	57,67	Argila
5	34,00	12,33	4,00	49,67	Argila; 2 Argilo-arenosa
6	30,67	11,67	3,33	54,33	Argila

Os solos 3, 4 e 5 (3 e 4 de reserva legal e 5 de preservação permanente) apresentaram as maiores quantidades de carbono orgânico resultante de resíduos de plantas e animais em diferentes estágios de decomposição. Em solos sob vegetação natural, a preservação da matéria orgânica tende a ser maior, pois o revolvimento do solo é mínimo sendo o aporte de carbono em florestas maior do que em áreas cultivadas. Nestas, as frações orgânicas são mais expostas ao ataque de micro-organismos, em função do maior revolvimento e desestruturação do solo (Tabela 6).

3.2. Extração do DNA

A concentração de DNA nos extratos obtidos das amostras 2 (eucalipto, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal), 3 (mata, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal) e 4 (idem 3, Latossolo) foi maior do que a obtida nas demais amostras (Figura 1). A concentração de DNA no extrato obtido da amostra 1 (eucalipto, Latossolo e Lagoa Cristal) foi menor, contrastando com a maior concentração da amostra 4 sob mata atlântica no mesmo local e tipo de solo (Figura 1).

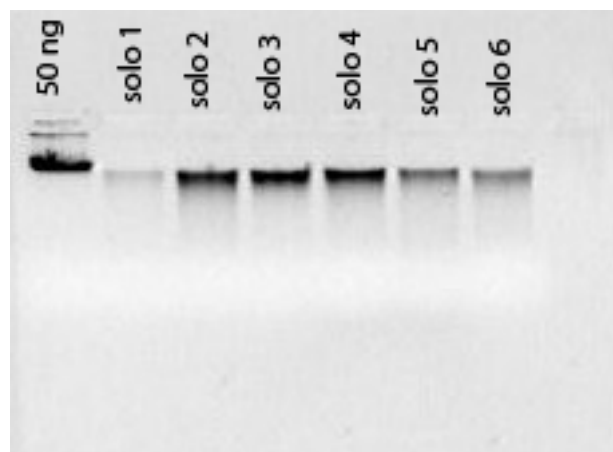


Figura 1 – Gel de agarose do DNA extraído das amostras de solo com uso do Kit MoBio PowerSoil™ DNA Isolation (cat. 12888-100). Foram aplicados 3 μ L de cada extrato acrescidos de 3 μ L do corante azul de bromofenol. Foi utilizado o marcador de quantidade de 50 ng a fim de comparação. Solo1: eucalipto, Latossolo e Lagoa Cristal; Solo 2: eucalipto, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; Solo 3: mata, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; Solo 4: mata, Latossolo e Lagoa Cristal; Solo 5: mata, Latossolo e Lagoa do Jacinto; e Solo 6: eucalipto, Latossolo e Lagoa do Jacinto.

Tabela 6 – Valores de indicadores químicos das seis amostras de solo coletadas em áreas pertencentes à CENIBRA (Celulose Nipo-Brasileira) no Município de Ipaba, Região do Vale do Rio Doce em Minas Gerais: pH em água, KCl e CaCl₂ com a relação 1:2,5; quantificação de P, Na, K, e Zn, Mn e Cu (Extrator Mehlich I); quantificação de H + Al (extrator acetato de cálcio 0,5 mol/L – pH 7,0); soma de bases trocáveis; capacidade de troca catiônica efetiva e capacidade de troca catiônica a pH 7,0; índice de saturação de bases; índice de saturação de alumínio; índice de saturação de sódio; fósforo remanescente e matéria orgânica como produto do carbono orgânico pelo valor 1,724 – Walkley-Black

Amostra	pH	P	K	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H + Al	SB	(t)	(T)	V	m	MO	P-rem	Zn	Fe	Mn	Cu	C.Org.
	H ₂ O	mg/dm ³		cmol _c /dm ³						%		dag/Kg	mg/L	mg/dm ³			dag/Kg		
1	4,60	2,20	14,33	0,76	0,20	1,09	6,33	0,99	2,09	7,29	13,60	52,63	3,12	31,07	0,70	50,40	5,13	0,37	1,81
2	5,45	3,07	78,33	2,47	0,62	0,00	2,23	3,29	3,29	5,52	59,50	0,00	2,37	41,93	2,91	8,57	37,53	0,73	1,38
3	4,98	1,83	78,33	2,26	1,72	0,10	5,23	4,18	4,28	9,41	44,43	2,33	5,22	33,23	3,75	33,57	63,93	1,50	3,03
4	4,00	1,77	22,67	0,18	0,18	1,58	8,07	0,42	2,00	8,49	4,90	52,60	4,30	26,63	0,76	67,93	7,90	0,46	2,49
5	3,89	1,30	12,67	0,20	0,14	1,48	6,33	0,37	1,85	6,70	5,47	80,33	3,16	30,90	0,91	56,23	5,77	0,13	1,83
6	3,92	2,47	12,00	0,10	0,06	1,64	7,13	0,19	1,82	7,32	2,53	89,70	2,72	30,37	0,76	68,23	2,83	0,29	1,58

A concentração de DNA nos extratos obtidos da amostra 2 (eucalipto, Neossolo flúvico, Lagoa Cristal) foi maior do que a concentração de DNA no extrato obtido da amostra 1 (eucalipto, Latossolo, Lagoa Cristal), mostrando efeito tanto do tipo de solo quanto da condição da área 2 estar entre períodos de plantio de eucalipto, as árvores haviam sido colhidas a seis meses.

Os solos 1 (eucalipto, Latossolo, Lagoa Cristal) e 6 (eucalipto, Latossolo, Lagoa do Jacinto) apresentaram as menores concentrações de DNA e se diferenciam dos demais solos, ambas classificadas como Latossolo e de uso para plantio de eucalipto (Figura 1).

3.3. PCR, DGGE, Análise de Similaridade e Índice de Diversidade para Eubacteria

A imagem obtida da eletroforese do gel de agarose dos produtos da PCR mostra amplificação homogênea entre todas as amostras (Figura 2).

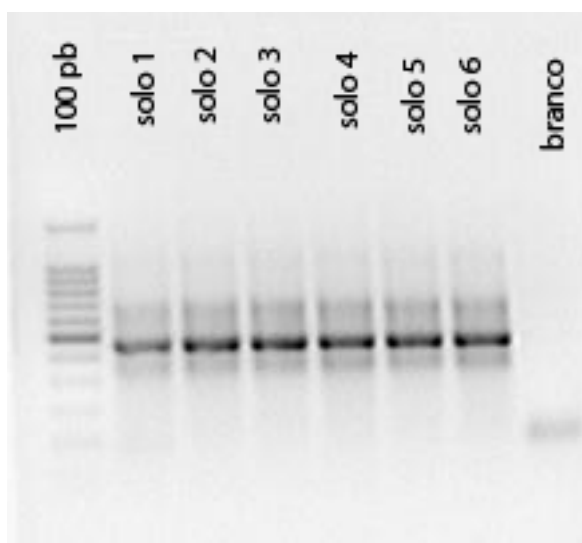


Figura 2 – Gel de agarose do resultado da PCR para Eubacteria, utilizando iniciadores universais. Foram aplicados 5 μ L de cada amplificado. Foi utilizado o marcador de tamanho de 100 pb a fim de comparação. Solo 1: eucalipto, Latossolo e Lagoa Cristal; Solo 2: eucalipto, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; Solo 3: mata, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; Solo 4: mata, Latossolo e Lagoa Cristal; Solo 5: mata, Latossolo e Lagoa do Jacinto; e Solo 6: eucalipto, Latossolo e Lagoa do Jacinto. Branco corresponde aos reagentes da PCR sem o DNA molde.

Os solos 1, 4, 5 e 6, todos da classe Latossolo, apresentaram bandas mais intensas quando comparadas com as das amostras 2 e 3 referentes aos solos da classe Neossolo. As amostras de cada classe de solo não apresentaram diferença entre si quanto à presença e a intensidade das bandas (Figura 3).

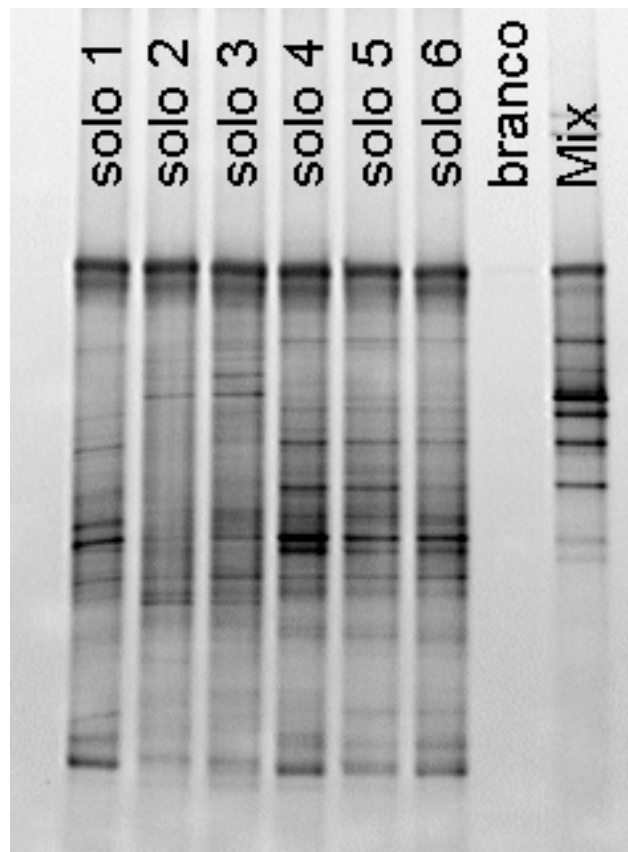


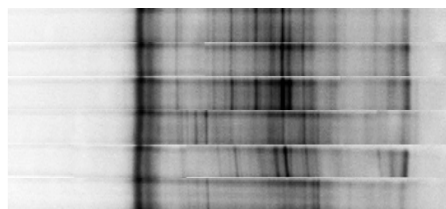
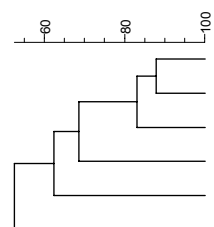
Figura 3 – Perfil eletroforético em DGGE de produtos de PCR dos fragmentos de 16S rDNA utilizando iniciadores para Eubacteria. Foram aplicados 20 μ L de cada produto da amplificação. Solo 1: eucalipto, Latossolo e Lagoa Cristal; Solo 2: eucalipto, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; Solo 3: mata, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; Solo 4: mata, Latossolo e Lagoa Cristal; Solo 5: mata, Latossolo e Lagoa do Jacinto; e Solo 6: eucalipto, Latossolo e Lagoa do Jacinto. Branco corresponde à reação de PCR sem a adição do DNA molde.

eubac1 (6 entries)

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

eubac1

eubac1



Número	Situação	Solo	Projeto	Obs						
05	preservação perm.	latossolo	lagoa do jacinto	mata	100					
06	eucalipto	latossolo	lagoa do jacinto	árvores	87.8	100				
04	reserva legal	latossolo	lagoa cristal	mata	79.1	87.0	100			
03	reserva legal	neo. flúvico	lagoa cristal	mata	63.4	72.7	69.6	100		
01	eucalipto	latossolo	lagoa cristal	árvores	62.9	68.4	60.0	57.9	100	
02	eucalipto	neo. flúvico	lagoa cristal	colhida 6 m	47.1	54.1	51.3	64.9	45.2	100

Figura 4 – Análise de similaridade para Eubacteria com uso do *software* GelComparII®. Os números correspondem às áreas amostradas

As áreas 3, 4, 5 e 6 apresentaram os maiores índices de diversidade (Figura 5), sendo a área 4 a de maior índice e número de UTOs, 24. As áreas 3, 4 e 5 são ocupadas por mata, enquanto a área 6 refere-se à floresta de eucalipto no projeto Lagoa do Jacinto. Essa área equipara-se às áreas de mata quanto ao índice de diversidade. A área 2, onde as árvores haviam sido colhidas seis meses antes da coleta, apresentou o menor índice de diversidade. Ressalta-se que o número de UTOs nesta área foi similar ao encontrado na área 1 onde as árvores de eucalipto estavam com dois anos de idade. Esse fato foi atribuído a deposição de matéria orgânica e a presença de raízes em decomposição na área 2, propiciando a dominância de algumas populações (Tabela 7).

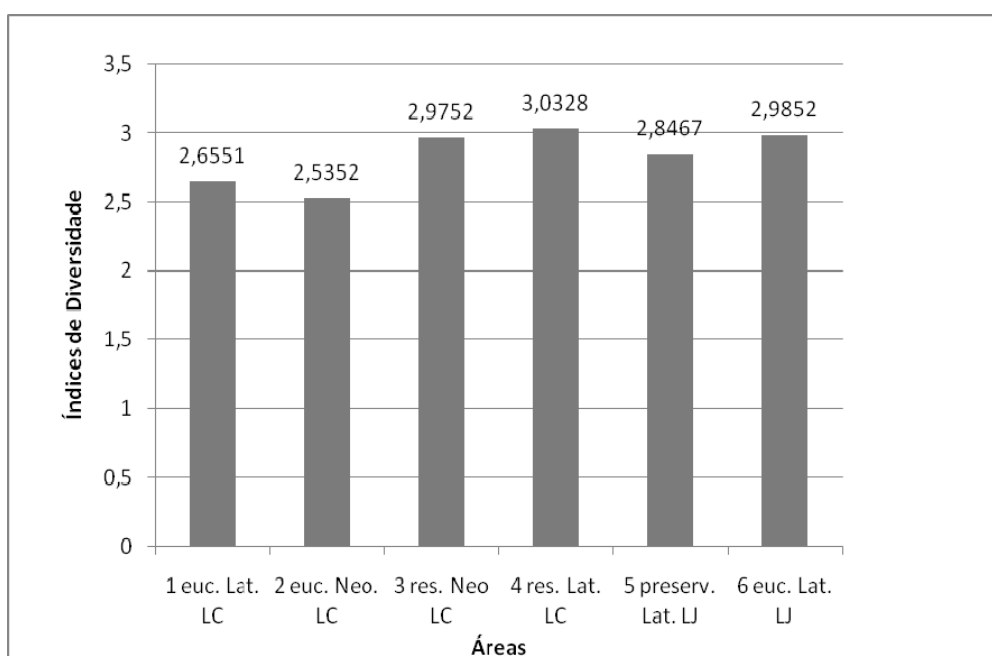


Figura 5 – Índices de diversidade de Eubacteria em solos sob cultivo de eucalipto ou mata atlântica. Simbologia: euc.: eucalipto; lat.: Latossolo; neo.: Neossolo flúvico; LC: Lagoa Cristal; LJ: Lagoa do Jacinto; res.: reserva legal; e preserv.: preservação permanente.

A análise de similaridade realizada pelo *software* GelComparII® mostrou uma maior semelhança entre as áreas 5 (mata, Latossolo e Lagoa do Jacinto) e 6 (eucalipto, Latossolo e Lagoa do Jacinto) e destes com a área 4 (mata Latossolo e Lagoa Cristal) (Figura 4). A área 3, embora tenha apresentado um dos maiores índices de diversidade (Figura 5) se distinguiu em relação às

Tabela 7 – Média dos índices de diversidade de Eubacteria para as áreas de eucalipto e mata das seis amostras de solo coletadas em áreas pertencentes à CENIBRA (Celulose Nipo-Brasileira) no Município de Ipaba, Região do Vale do Rio Doce em Minas Gerais, de acordo com os dados da Figura 5

Cobertura Vegetal	Média dos Índices de Diversidade
Eucalipto	2.725
Mata natural	2.952

três primeiras na similaridade. A área 2, que apresentou o menor índice de diversidade também apresentou a menor similaridade com as demais áreas (Figura 4).

A análise da diversidade de Eubacteria mostrou que as áreas correspondentes à mata natural foram as que apresentaram os maiores índices de diversidade. Em contrapartida, as áreas sob plantação de eucalipto apresentaram os menores índices, com exceção da área 6, que apresentou o segundo maior índice. Esta área não apresentou nenhuma característica visível que pudesse justificar este resultado e por ser um projeto diferente (Lagoa do Jacinto) das áreas 1 e 2 (Lagoa Cristal), é recomendável a realização de estudos mais aprofundados na área (Figura 5).

Nas áreas de mata (3, 4 e 5), de um máximo de 24 UTOs percebidas, cinco se repetiram nas 3 áreas e oito somente em dois delas (Tabela 8). Essas repetições confirmam a análise de similaridade obtida (Figura 4), onde as áreas 3, 4 e 5 (mata), junto com a área 6 (eucalipto, Lagoa do Jacinto) apresentaram os maiores graus de similaridade, assim como várias UTOs com a mesma posição de referência (Tabela 10).

Não houve diferença significativa entre os índices de diversidade dos dois tipos de solo em estudo, Latossolo e Neossolo flúvico. A média dos índices de diversidade dos solos do tipo Latossolo foi de 2.880 e a média referente aos solos do tipo Neossolo flúvico foi de 2.755, apresentando uma diferença entre eles de 4,3% em relação ao maior valor (Tabela 9).

A análise de similaridade (Figura 4) mostrou um agrupamento das áreas do projeto Lagoa do Jacinto (5 e 6), seguidos das áreas de mata (3 e 4) e por última as áreas de eucalipto do projeto Lagoa Cristal (1 e 2).

Tabela 8 – Unidades taxonômicas operacionais (UTOs) e seus volumes obtidos no gel de DGGE de Eubacteria em cada área após uso do software GelComparII®. Área 1: eucalipto, Latossolo e Lagoa Cristal; Área 2: eucalipto, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; Área 3: mata, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; Área 4: mata, Latossolo e Lagoa Cristal; Área 5: mata, Latossolo e Lagoa do Jacinto; e Área 6: eucalipto, Latossolo, Lagoa do Jacinto. O volume corresponde à intensidade de *pixels* da banda detectada pelo programa

UTOs	Volumes					
	Áreas					
	1	2	3	4	5	6
1	26.658	55.086	27.246	28.035	26.281	26.701
2	23.758	31.070	32.107	15.781	14.446	24.508
3	8.913	27.904	21.250	11.072	11.417	11.214
4	6.314	15.939	19.691	7.263	6.466	12.656
5	5.469	18.659	18.700	8.824	7.554	4.943
6	8.281	15.264	18.700	10.615	8.826	7.471
7	10.724	26.324	11.999	5.135	11.753	4.277
8	12.920	18.923	9.377	10.367	10.331	8.527
9	12.517	19.071	8.001	9.481	18.669	9.239
10	8.812	18.773	5.812	15.108	17.828	13.620
11	11.273	10.646	7.366	18.058	11.803	15.079
12	10.184	8.738	8.624	31.091	5.283	18.913
13	9.695	12.152	19.013	18.917	14.684	12.734
14	4.481	7.380	16.097	6.051	8.467	6.434
15	7.594	3.898	14.922	10.828	7.463	11.882
16	9.299		16.524	5.339	4.240	6.279
17			14.361	9.087	8.613	12.536
18			9.778	9.912	8.627	11.798
19			8.954	10.705	9.772	5.208
20			7.469	5.711		10.538
21			11.617	12.511		12.441
22			4.089	12.511		13.011
23				12.035		
24				1.293		

Nas áreas de eucalipto (Figura 4, raias 1 e 2) não se observam repetições de UTOs, uma indicação da diversidade nas suas comunidades e, por conseguinte, menores graus de similaridade com as demais.

Tabela 9 – Média dos índices de diversidade de Eubacteria, de acordo com as classes de solo das seis amostras de solo coletadas em áreas pertencentes à CENIBRA (Celulose Nipo-Brasileira) no Município de Ipaba, Região do Vale do Rio Doce em Minas Gerais, conforme dados da Figura 5

Classe de Solo	Média dos Índices de Diversidade
Latossolo	2.880
Neossolo	2.755

Tabela 10 – Posição de referência e volumes das UTOs no gel de DGGE para Eubacteria, determinado pelo *software* GelComparII[®]. Posição de referência dada pela altura da banda no gel. Área 1: eucalipto, Latossolo e Lagoa Cristal; Área 2: eucalipto, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; Área 3: mata, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; Área 4: mata, Latossolo e Lagoa Cristal; Área 5: mata, Latossolo e Lagoa do Jacinto; e Área 6: eucalipto, Latossolo, Lagoa do Jacinto

Posição de Referência	Áreas					
	1	2	3	4	5	6
83		55.086				
92	26.658	31.070				
93			27.246	28.035	26.281	
94						26.701
98	23.758					
99		27.904			14446	
99						
100			32.107	15.781		
101						24.508
106			21.250			
114			19.691			
120			18.700	11072	11417	11214
123	8.913		18.700			
126			11.999			
133		15.939	9.377			
135						12.656
136				7.263		
140		18.659	8.001			
141					6.466	4.943
142				8.824		
146				10.615	7.554	7.471
147			5.812			
149	6.314					

Continua...

Tabela 10, Cont.

Posição de Referência	Áreas					
	1	2	3	4	5	6
153						4.277
154				5.135		
156	5.469		7.366			
158				10.367	8.826	8.527
160	8.281					
169				9.481	11.753	9.239
173			8.624			
175				15.108		
176					10.331	13.620
179	10.724					
182					18.669	
183						15.079
186			19.013	18.058	17.828	
187						18.913
188	12.920					
191		15.264				
194		26.324	16.097	31.091		12.734
195	12.517				11.803	
199	8.812		14.922	18.917	5.283	6.434
209		18.923	16.524	6.051	14.684	11.882
210	11.273					
214				10.828	8.467	6.279
215		19.071	14.361			
216	10.184					
218		18.773	9.778			
225		10.646		5.339		
226			8.954			
228				9.087		12.536
230					7.463	
231						11.798
232	9.695					
238					4.240	
240		8.738				
252			7.469			5.208
255		12.152				
256				9.912		
259				10.705		
260						10.538
261	4.481				8.613	
264				5.711		
269				12.511		
270	7.594					
271				12.511	8.627	
272						12.441

Continua...

Tabela 10, Cont.

Posição de Referência	Áreas					
	1	2	3	4	5	6
277		7.380				
279	9.299		11.617			
281				12.035	9.772	
282						13.011
287		3.898	4.089			
288				1.293		

3.4. PCR, DGGE, análise de similaridade e índice de diversidade para α -Proteobacteria

A imagem obtida da eletroforese do gel de agarose dos produtos de PCR mostra amplificação maior nas amostras 2 e 3 de Neossolo e da amostra 4 de Latossolo de mata (Figura 6).

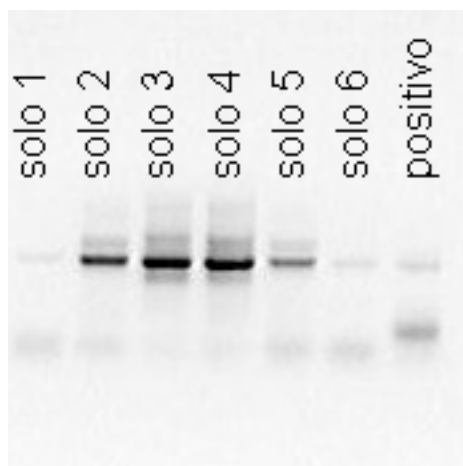


Figura 6 – Gel de agarose do resultado de PCR para α -Proteobacteria utilizando *primers* específicos. Foram aplicados 5 μ L de cada amplificado. Solo 1: eucalipto, Latossolo e Lagoa Cristal; Solo 2: eucalipto, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; Solo 3: mata, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; Solo 4: mata, Latossolo e Lagoa Cristal; Solo 5: mata, Latossolo e Lagoa do Jacinto; e Solo 6: eucalipto, Latossolo e Lagoa do Jacinto. Branco corresponde aos reagentes da PCR sem o DNA molde. O controle positivo utilizado foi *Agrobacterium tumefaciens*.

Os solos 3 e 4, ambos usados como reserva legal apresentaram bandas mais intensas (Figura 7).

Os solos 1 e 6, ambos de plantio de eucalipto, não apresentaram bandas perceptíveis. Esse fato pode ser reflexo de menor número de indivíduos em populações, que não seriam detectadas pela sensibilidade da técnica (Figura 7).

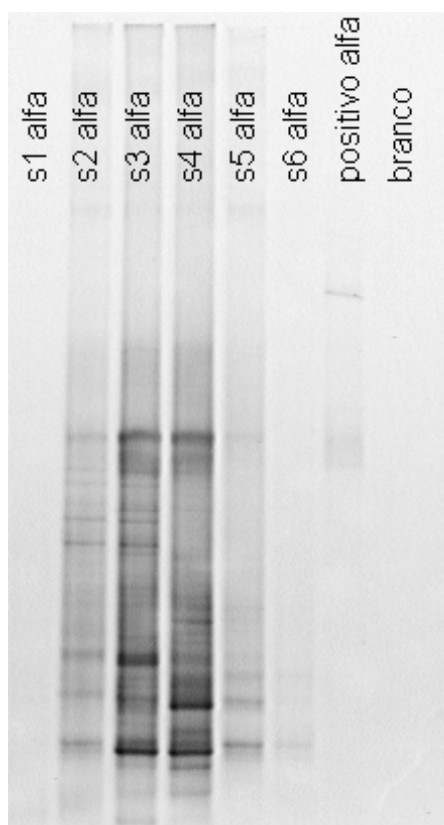


Figura 7 – Perfil eletroforético em DGGE de produtos de PCR dos fragmentos de 16S rDNA utilizando iniciadores para α -Proteobacteria. Foram aplicados 20 μ L de cada produto da amplificação. S1: solo de eucalipto, Latossolo e Lagoa Cristal; S2: solo de eucalipto, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; S3: solo de mata, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; S4: solo de mata, Latossolo e Lagoa Cristal; S5: solo de mata, Latossolo e Lagoa do Jacinto; e S6: solo de eucalipto, Latossolo e Lagoa do Jacinto. Branco corresponde a PCR sem a adição do DNA molde. O controle positivo utilizado foi *Agrobacterium tumefaciens*.

alfa1 (6 entries)

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

alfa1

alfa1

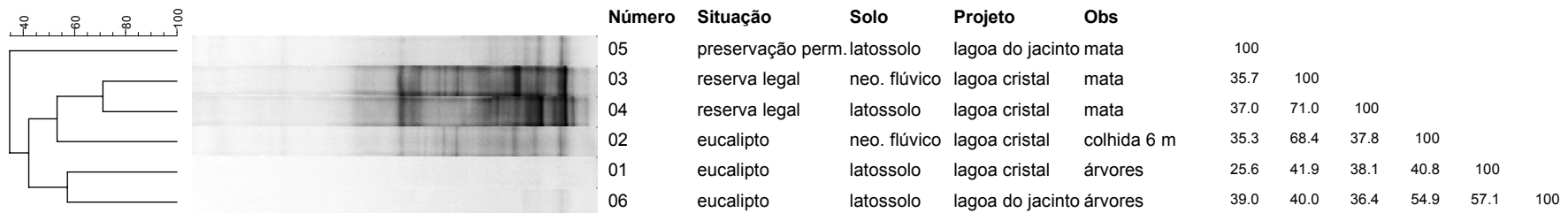


Figura 8 – Análise de similaridade para α -Proteobacteria com uso do software GeComparII[®]. Os números correspondem às áreas amostradas.

As áreas 1 e 6 apresentaram os maiores índices de diversidade (Figura 9) mas, pela análise da imagem do gel, estas raia apresentaram muitas bandas de pequena intensidade, podendo significar um grande número de UTOs de populações pequenas (Figura 7).

As áreas 3 e 4 apresentaram índices semelhantes e as suas bandas apresentaram maior intensidade (Figuras 8 e 9).

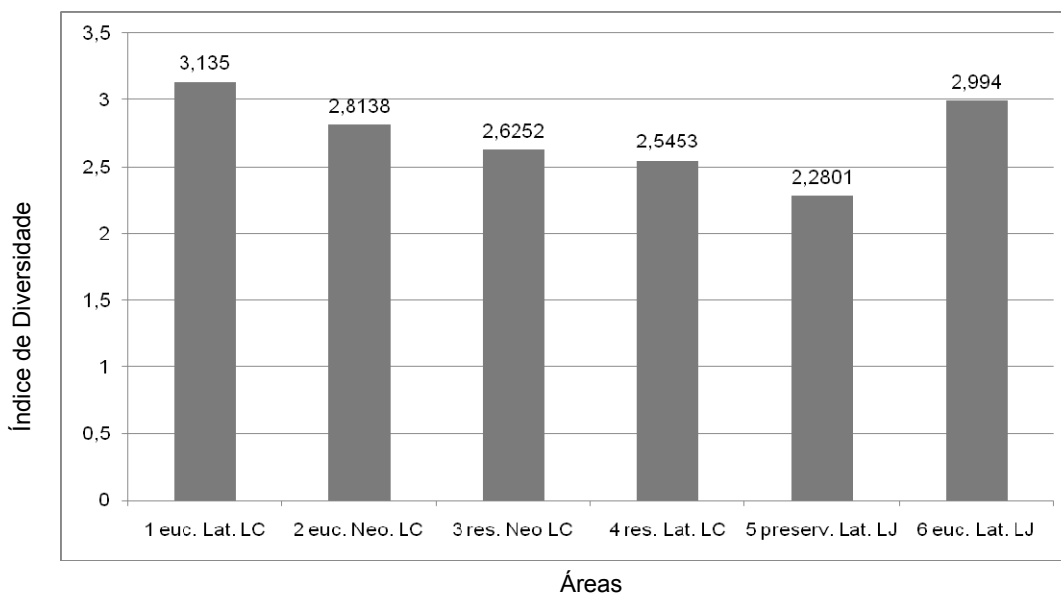


Figura 9 – Índices de diversidade de α -Proteobacteria em solos sob cultivo de eucalipto ou mata atlântica. Simbologia = euc.: eucalipto; lat.: Latossolo; neo.: Neossolo flúvico; LC: Lagoa Cristal; LJ: Lagoa do Jacinto; res.: reserva legal; e preserv.: preservação permanente.

Para α -Proteobacteria, as áreas referentes à mata ou preservação permanente (3, 4 e 5), apresentaram os menores índices de diversidade. A análise visual da imagem do gel permite observar várias UTOs de pequena intensidade, possivelmente uma comunidade variada formada por populações com pequeno número de organismos, além das populações dominantes. A área 2, onde as árvores de eucalipto haviam sido colhidas, apresentou um elevado índice para este grupo (Figura 9).

As áreas de Mata Nativa que apresentaram os menores índices, apresentam populações maiores (Tabela 12) A área 6, sob plantio de eucalipto no projeto Lagoa do Jacinto apresentou o segundo maior índice de diversidade.

Tabela 11 – Média dos índices de diversidade para as áreas de eucalipto e mata das seis amostras de solo coletadas em áreas pertencentes à CENIBRA (Celulose Nipo-Brasileira), no Município de Ipaba, região do Vale do Rio Doce, em Minas Gerais, de acordo com os dados da Figura 9

Cobertura Vegetal	Média dos Índices de Diversidade
Eucalipto	2.981
Mata	2.483

Tabela 12 – Unidades taxonômicas operacionais (UTOs) e seus volumes obtidos no gel de DGGE de α -Proteobacteria em cada área após uso do *software* GelComparII[®]. Área 1: eucalipto, Latossolo e Lagoa Cristal; Área 2: eucalipto, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; Área 3: mata, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; Área 4: mata, Latossolo e Lagoa Cristal; Área 5: mata, Latossolo e Lagoa do Jacinto; e Área 6: eucalipto, Latossolo e Lagoa do Jacinto. O volume corresponde à intensidade de *pixels* da banda detectada pelo programa

UTOs	Volumes					
	Áreas					
	1	2	3	4	5	6
1	183	1.669	9.258	9.171	1.274	75
2	273	852	21.750	6.347	1.534	142
3	443	1.753	16.645	21.458	1.840	98
4	353	1.787	13.261	23.838	1.834	542
5	346	1.810	11.989	5.853	4.925	412
6	314	6.653	5.677	3.960	2.311	365
7	710	2.844	16.023	7.584	4.031	555
8	660	2.097	10.286	9.624	3.748	276
9	425	3.331	10.695	17.934	6.389	272
10	432	3.890	16.676	23.714	8.332	476
11	671	4.330	28.793	26.564	9.448	229
12	635	2.126	37.922	20.028	9.044	143
13	1.477	1.164	15.721	23.184		705
14	475	2.446	28.337	12.249		798
15	337	4.176	8.539	4.073		1.113
16	304	5.777	3.810			1.750
17	641	8.905				1.122
18	604	6.407				0
19	988	7.851				2.346
20	981	641				379
21	768	870				1.148
22	1.036					610
23	737					785
24	1.478					1.150
25	668					2.702
26	732					2.176
27						2.498
28						541
29						755

A análise para α -Proteobacteria mostrou índices de diversidade maiores nas áreas de eucalipto do que nas áreas de mata (Figura 9).

Os índices não mostraram diferença significativa em relação ao tipo de solo, sendo a média dos índices de diversidade dos Latossolo de 2.738 e a média referente aos Neossolo flúvico de 2.719, apresentando uma diferença entre eles de 0,69% em relação ao maior valor (Tabela 13).

Tabela 13 – Média dos índices de diversidade para os solos de acordo com as classes Latossolo e Neossolo das seis amostras de solo coletadas em áreas pertencentes à CENIBRA (Celulose Nipo-Brasileira) no Município de Ipaba, Região do Vale do Rio Doce em Minas Gerais, conforme dados da Figura 9

Classe de Solo	Média dos Índices de Diversidade
Latossolo	2.738
Neossolo	2.719

A análise de similaridade mostrou uma maior semelhança entre as áreas 3 e 4 e estas com a área 2 e deixou bem diferenciadas as áreas 1, 5 e 6 (Figura 8).

A análise da imagem do gel das α -Proteobacteria não apresentou muitas repetições entre as UTOs percebidas (Tabela 14).

As repetições observadas nas áreas 3 e 4 (Tabela 14) reforçam o agrupamento obtido pela análise de similaridade (Figura 8).

3.5. PCR, DGGE, análise de similaridade e índice de diversidade para β -Proteobacteria

A imagem obtida da eletroforese do gel de agarose dos produtos de PCR mostra heterogeneidade entre todas as amostras (Figura 10).

As áreas 4 e 6 apresentaram bandas mais intensas, enquanto as áreas 1, 3 e 5 não apresentaram bandas perceptíveis (Figura 11). Isso foi atribuído a presença de menor número de indivíduos em populações, que não foram detectados pela sensibilidade da técnica.

Tabela 14 – Posição de referência e volumes das UTOs no gel de DGGE para α -Proteobacteria determinado pelo *software* GelComparII®. Posição de referência dada pela altura da banda no gel. Área 1: eucalipto, Latossolo e Lagoa Cristal; Área 2: eucalipto, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; Área 3: mata, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; Área 4: mata, Latossolo e Lagoa Cristal; Área 5: mata, Latossolo e Lagoa do Jacinto; e Área 6: eucalipto, Latossolo e Lagoa do Jacinto

Posição de Referência	Áreas					
	1	2	3	4	5	6
4						75
12	183					
14						142
17					1.274	
19						98
24	273					
27						542
29		1.669				
30					1.534	
44	443					
52	353					
58					1.840	
60						412
73						365
76		852				
81	346					
84						555
87		1753			1.834	
89	314					
101						276
104	710					
109	660					
120						272
123	425					
136	432					
140						476
147						229
153						143
155			9.258			
156				9.171		
159		1.787				
163	671			6.347		
164						705
172		1.810				
180						798
184	635					
197						1.113
198			21.750			

Continua...

Tabela 14, Cont

Posição de Referência	Áreas					
	1	2	3	4	5	6
199					4.925	
200		6.653		21.458		
203	1477					
209			16.645			
210				23.838		
211	475					
212						1.750
215	337	2.844				
216			13.261			
221	304					
222		2097				
224						1.122
229	641					
233		3.331				
235			11.989			
236						2.346
237	604					
240		3.890				
241			5.677			
245						379
249	988					
252		4.330				1.148
253			16.023			
257		2.126				
258	981					610
259				5.853		
262		1.164				
266					2.311	
273	768			3.960		
274			10.286			
275						785
277		2.446				
279				7.584		
282		4.176	10.695			
284	1.036				4.031	1150
290					3.748	
291				9.624		
296		5.777				
299			16.676			
307		8.905				
308					6.389	
310			28.793	17.934		
317	737					
318					8.332	2.702
322				23.714		
327		6.407				

Continua...

Tabela 14, Cont

Posição de Referência	Áreas					
	1	2	3	4	5	6
329			37.922			
330	1.478					
331					9.448	
332				26.564		
343			15.721			
346				20.028		
351		7.851				
352					9.044	2.176
355			28.337	23.184		
357	668					
358						2.498
361			8.539			
363				12.249		
364	732					
373						541
376			3.810	4.073		
378		641				
379						755
381		870				

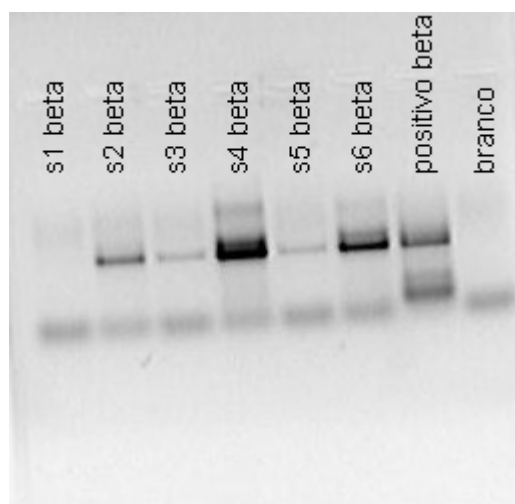


Figura 10 – Gel de agarose do resultado da PCR para β -Proteobacteria utilizando *primers* específicos. Foram aplicados 5 μ L de cada amplificado. S1: solo de eucalipto, Latossolo e Lagoa Cristal; S2: solo de eucalipto, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; S3: solo de mata, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; S4: solo de mata, Latossolo e Lagoa Cristal; S5: solo de mata, Latossolo e Lagoa do Jacinto; e S6: solo de eucalipto, Latossolo e Lagoa do Jacinto. Branco corresponde aos reagentes da PCR sem o DNA molde. O controle positivo utilizado foi *Alcaligenes xylosoxidans* (ATCC 13138).

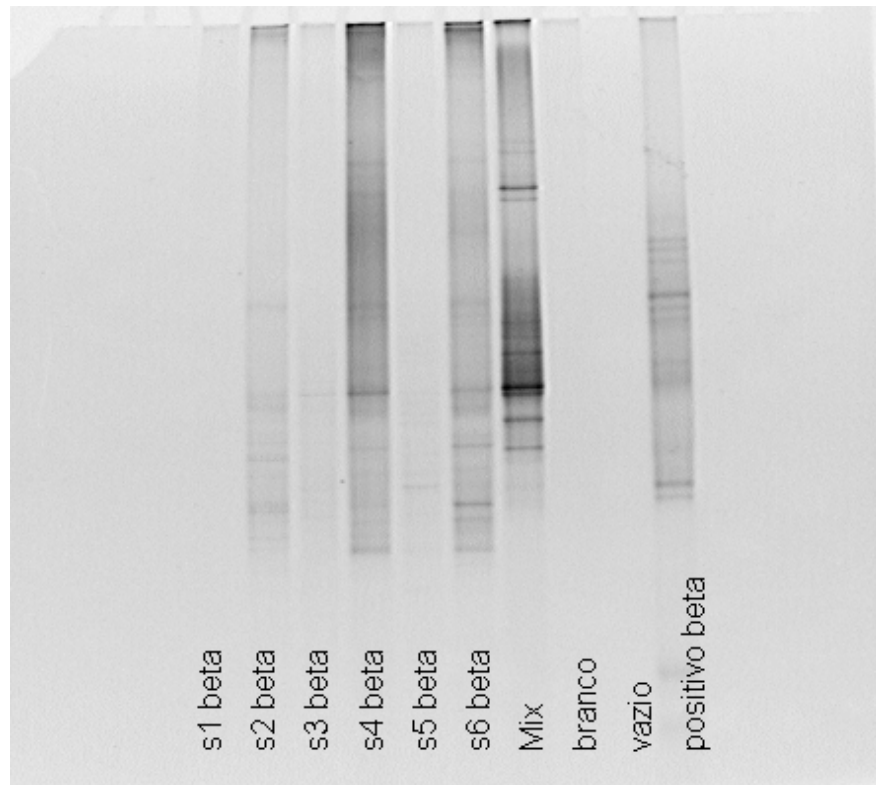


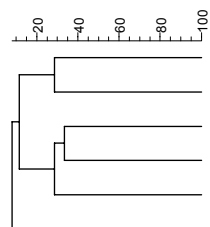
Figura 11 – Perfil eletroforético em DGGE de produtos de PCR dos fragmentos de 16S rDNA utilizando iniciadores para β -Proteobacteria. Foram aplicados 20 μ L de cada produto da amplificação. S1: solo de eucalipto, Latossolo e Lagoa Cristal; S2: solo de eucalipto, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; S3: solo de mata, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; S4: solo de mata, Latossolo e Lagoa Cristal; S5: solo de mata, Latossolo e Lagoa do Jacinto; e S6: solo de eucalipto, Latossolo, Lagoa do Jacinto. Branco corresponde à PCR sem a adição do DNA molde. O controle positivo utilizado foi *Alcaligenes xylosoxidans* (ATCC 13138).

beta1 (6 entries)

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

beta1

beta1



Número	Situação	Solo	Projeto	Obs						
01	eucalipto	latossolo	lagoa cristal	árvores	100					
05	preservação per.	latossolo	lagoa do jacinto	mata	28.6	100				
03	reserva legal	neo. flúvico	lagoa cristal	mata	18.2	26.7	100			
06	eucalipto	latossolo	lagoa do jacinto	árvores	0.0	0.0	33.3	100		
04	reserva legal	latossolo	lagoa cristal	mata	0.0	23.5	28.6	28.6	100	
02	eucalipto	neo. flúvico	lagoa cristal	colhida 6 m	0.0	12.5	0.0	0.0	26.7	100

Figura 12 – Análise de similaridade β -Proteobacteria com uso do software GelComparII[®]. Os números correspondem às áreas amostradas.

Em números absolutos, as áreas de mata apresentaram maiores índices de diversidade do que as áreas de eucalipto (Figura 13).

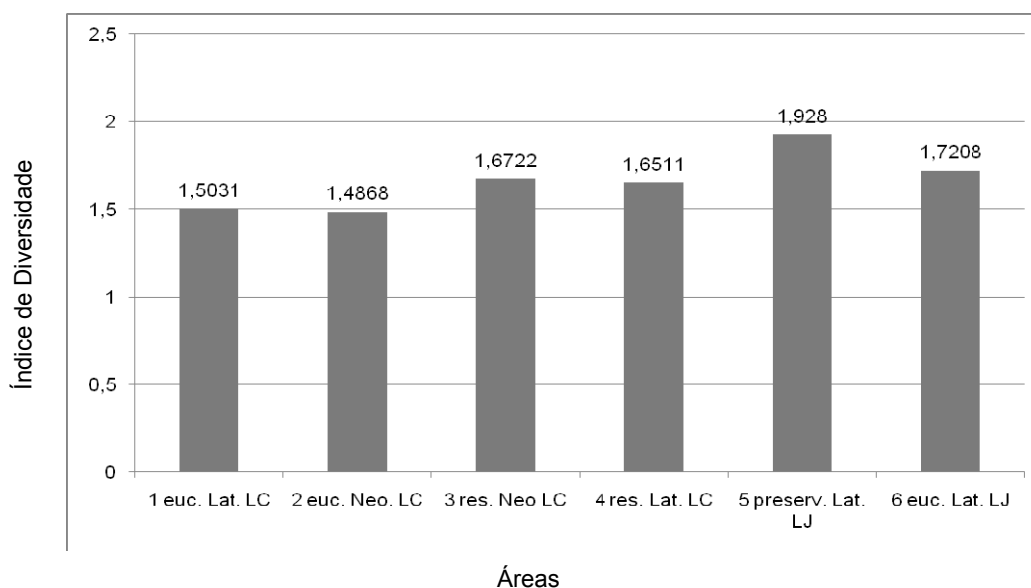


Figura 13 – Índices de diversidade de β -Proteobacteria em áreas sob cultivo de eucalipto ou mata atlântica. Simbologia: euc.= eucalipto; lat. = Latossolo; neo. = Neossolo flúvico; LC: Lagoa Cristal; LJ: Lagoa do Jacinto; res.: reserva legal; e preserv.: preservação permanente.

Tabela 15 – Média dos índices de diversidade para as áreas de eucalipto e mata das seis amostras de solo coletadas em áreas pertencentes à CENIBRA (Celulose Nipo-Brasileira), no município de Ipaba, região do Vale do Rio Doce, em Minas Gerais, de acordo com os dados da Figura 13

Cobertura Vegetal	Média dos Índices de Diversidade
Eucalipto	1.570
Mata	1.750

As áreas 5, 6, 3 e 4 apresentaram os maiores índices de diversidade (Figura 13). Nesse grupo, a área 6 também apresentou índice de diversidade maior em áreas de mata, assim como ocorreu na análise de Eubacterias. Novamente, para a avaliação dos fatores que resultaram na maior diversidade nessa área são necessários outros estudos.

Tabela 16 – Unidades taxonômicas operacionais (UTOs) e seus volumes obtidos no gel de β -Proteobacteria em cada área após uso do *software* GelComparII®. Área 1: eucalipto, Latossolo e Lagoa Cristal; Área 2: eucalipto, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; Área 3: mata, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; Área 4; mata, Latossolo e Lagoa Cristal; Área 5: mata, Latossolo e Lagoa do Jacinto; e Área 6: eucalipto, Latossolo e Lagoa do Jacinto. O volume corresponde à intensidade de *pixels* da banda detectada pelo programa

UTOs	Volumes					
	Áreas					
	1	2	3	4	5	6
1	797	383	494	18.313	487	7.625
2	753	328	2.322	13.841	364	4.252
3	165	3.290	842	8.991	620	11.543
4	416	3.766	1.881	3.316	362	5.475
5	554	2.197	1.742	4.642	332	5.135
6	-	5.656	917	5.700	1.191	4.431
7	-	-	-	324	1.511	-
8	-	-	-	-	840	-

As áreas 1 e 2 sob plantio de eucalipto na área do projeto Lagoa do Jacinto apresentaram os menores índices de diversidade, comparativamente com as áreas de mata (Figura 13). A área 4 foi a que apresentou bandas com maiores intensidades, sendo também a que apresentou maior quantidade de DNA genômico extraído. Este grupo de bactérias apresentou poucas UTOs (Figura 11).

A análise de similaridade mostrou um maior agrupamento entre as áreas 1 e 5; 3 e 6 e estas com a área 4; ficando a área 2 mais diferenciada das demais (Figura 12).

Os índices não mostraram diferença significativa em relação ao tipo de solo. A média dos índices de diversidade dos Latossolo foi de 1.700 e a média referente ao Neossolo flúvico foi de 1.579, apresentando uma diferença entre eles de 7,12% em relação ao maior valor (Tabela 17).

Em β -Proteobacteria não ocorreram repetições de UTOs dentro das áreas em estudo. Os menores graus de similaridade obtidos nestas áreas foram atribuídos a esse fato (Figura 12). Estas UTOs podem indicar um caminho para a obtenção de marcadores para a avaliação do impacto dos fatores de estresse sobre este grupo (Tabela 18).

Tabela 17 – Média dos índices de diversidade para o Latossolo e o Neossolo das seis amostras de solo coletadas em áreas pertencentes à CENIBRA (Celulose Nipo-Brasileira), no município de Ipaba, Região do Vale do Rio Doce, em Minas Gerais, de acordo com os dados da Figura 13

Classe de Solo	Média dos Índices de Diversidade
Latossolo	1.700
Neossolo	1.579

Tabela 18 – Posição de referência e volumes das UTOs no gel de DGGE para o grupo β -Proteobacteria determinado pelo *software* GelComparII[®]. Posição de referência dada pela altura da banda no gel. Área 1: eucalipto, Latossolo e Lagoa Cristal; Área 2: eucalipto, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; Área 3: mata, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; Área 4: mata, Latossolo e Lagoa Cristal; Área 5: mata, Latossolo e Lagoa do Jacinto; e Área 6: eucalipto, Latossolo e Lagoa do Jacinto

Posição de Referência	Áreas					
	1	2	3	4	5	6
7			494			
22					487	
27	797					
44			2.322			
47					364	
64		383				
73	753					
78					620	
84		328				
94						7.625
98				18.313		
104			842			
105					362	
134					332	
138		3.290				
140						4.252
142				13.841		
183			1.881			
184	165			8.991		
187						11.543
190		3766				
193					1.191	

Continua...

Tabela 18, Cont.

Posição de Referência	Áreas					
	1	2	3	4	5	6
211				3.316		5.475
216		2.197				
230	416					
233					1.511	
238			1.742			
240				4.642		
243						5.135
244		5.656				
260						4.431
262				5.700		
265	554					
266					840	
269			917			
287				324		

3.6. PCR, DGGE, análise de similaridade e índice de diversidade para γ -Proteobacteria

A imagem obtida da eletroforese do gel de agarose dos produtos de PCR mostra amplificação homogênea entre todas as amostras (Figura 14).

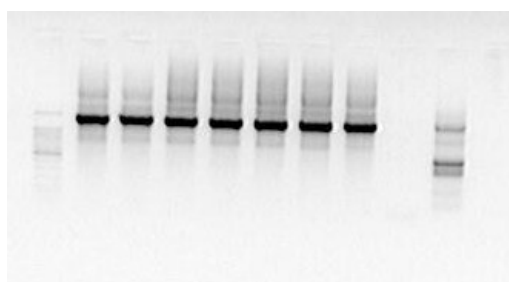


Figura 14 – Gel de agarose do resultado de PCR para γ -Proteobacteria na seguinte ordem da esquerda para direita: 100 bp, Área 1a, Área 1b, Área 2, Área 3, Área 4, Área 5, Área 6, branco e controle positivo, utilizando *primers* específicos. Foram aplicados 5 μ L de cada amplificado. Áreas 1a e 1b: eucalipto, Latossolo e Lagoa Cristal; Área 2: eucalipto, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; Área 3: mata, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; Área 4: mata, Latossolo e Lagoa Cristal; Área 5: mata, Latossolo e Lagoa do Jacinto; e Área 6: eucalipto, Latossolo e Lagoa do Jacinto. Branco corresponde aos reagentes da PCR sem o DNA molde. O controle positivo utilizado foi *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525). A área 1 foi aplicada duas vezes para se comparar e confirmar o resultado da amplificação.

Todas as amostras apresentaram um padrão uniforme de bandejamento, tanto quanto ao número quanto a intensidade das bandas (Figura 15).

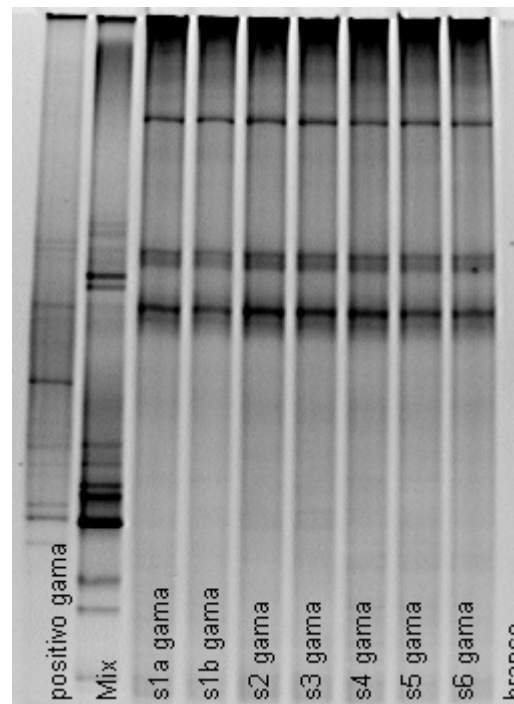


Figura 15 – Perfil eletroforético em DGGE de produtos de PCR dos fragmentos de 16S rDNA utilizando iniciadores para γ -Proteobacteria. Foram aplicados 20 μ L de cada produto da amplificação. S1a e b: solo de eucalipto, Latossolo e Lagoa Cristal; S2: solo de eucalipto, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; S3: solo de mata, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; S4: solo de mata, Latossolo e Lagoa Cristal; S5: solo de mata, Latossolo e Lagoa do Jacinto; e S6: solo de eucalipto, Latossolo e Lagoa do Jacinto. Branco corresponde à reação de PCR sem a adição do DNA molde. O controle positivo utilizado foi *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525). A área 1 foi aplicada duas vezes para se comparar e confirmar o comportamento da amplificação no gel.

gama1 (6 entries)

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

gama1

gama1

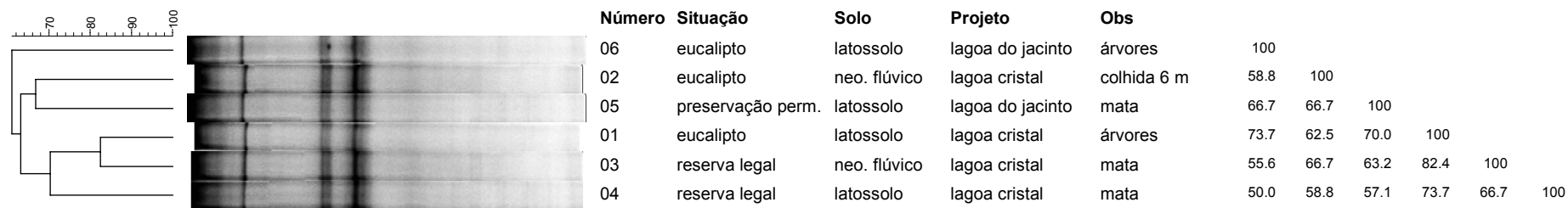


Figura 16 – Análise de Similaridade para γ -Proteobacteria com uso do software GelComparII[®]. Os números correspondem às áreas amostradas.

Os índices não mostraram diferença significativa em relação ao uso do solo. A média dos índices de diversidade dos solos de eucalipto foi de 2.042 e a média referente aos solos de mata foi de 2.201, apresentando uma diferença entre eles de 7,22% em relação ao maior valor (Figura 17).

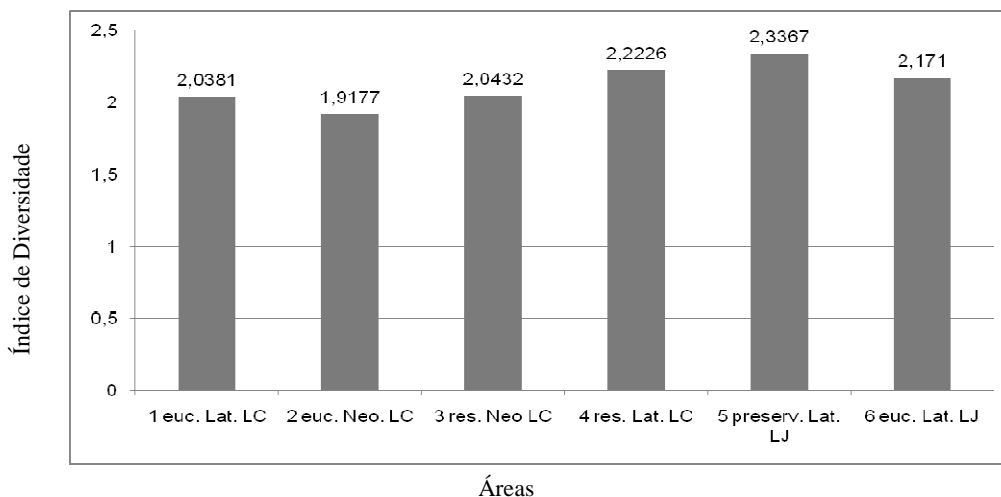


Figura 17 – Índices de diversidade de γ -Proteobacteria em áreas sob cultivo de eucalipto ou mata atlântica. Simbologia: euc.: eucalipto; lat.: Latossolo; neo.: Neossolo flúvico; LC: Lagoa Cristal; LJ: Lagoa do Jacinto; res.: reserva legal; e preserv.: preservação permanente.

Tabela 19 – Média dos índices de diversidade para as áreas de eucalipto e mata das seis amostras de solo coletadas em áreas pertencentes à CENIBRA (Celulose Nipo-Brasileira), no município de Ipaba, região do Vale do Rio Doce em Minas Gerais, de acordo com os dados da Figura 17

Cobertura Vegetal	Média dos Índices de Diversidade
Eucalipto	2.042
Mata	2.201

As áreas 5, 4, 6 e 3 apresentaram os maiores índices respectivamente. Novamente, a área 6 aparece com alto índice de diversidade. As áreas sob plantio de eucalipto (1 e 2) apresentaram os menores índices (Figura 17).

Os índices não mostraram diferença em relação ao tipo de solo. A média dos índices de diversidade dos solos do tipo Latossolo foi de 2.192 e a média referente aos solos do tipo Neossolo flúvico foi de 1.980, apresentando uma diferença entre eles de 9,65% em relação ao maior valor (Figura 17).

Tabela 20 – Unidades taxonômicas operacionais (UTOs) e seus volumes obtidos no gel de DGGE de γ -Proteobacteria em cada área após uso do *software* GelComparII[®]. Área 1: eucalipto, Latossolo e Lagoa Cristal; Área 2: eucalipto, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; Área 3: mata, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; Área 4: mata, Latossolo e Lagoa Cristal; Área 5: mata, Latossolo e Lagoa do Jacinto; e Área 6: eucalipto, Latossolo e Lagoa do Jacinto. O volume corresponde à intensidade de *pixels* da banda detectada pelo programa

UTOs	Volumes					
	Áreas					
	1	2	3	4	5	6
1	20.195	25.913	17.401	27.179	20.144	17.084
2	8.974	11.700	11.341	24.296	11.717	13.618
3	7.855	20.676	18.408	33.541	6.857	7.216
4	16.526	21.076	19.166	10.254	16.822	3.026
5	17.119	22.458	20.669	10.510	17.356	14.624
6	17.677	14.664	13.916	20.232	17.071	14.063
7	17.755	22.186	8.070	20.953	18.373	13.738
8	17.335		18.370	20.949	8.081	5.166
9				17.625	26.318	3.809
10				8.298	22.604	7.215
11					15.547	

Tabela 21 – Média dos índices de diversidade para os solos das seis amostras de solo coletadas em áreas pertencentes à CENIBRA (Celulose Nipo-Brasileira), no município de Ipaba, região do Vale do Rio Doce, em Minas Gerais, de acordo com as classes Latossolo e Neossolo, de acordo com os dados da Figura 17

Classe de Solo	Média dos Índices de Diversidade
Latossolo	2.192
Neossolo	1.980

A análise de similaridade mostrou a mesma heterogeneidade do grupo β -Proteobacteria, não agrupando as áreas por nenhuma das características dos solos (Figura 16).

As áreas de mata (3, 4 e 5) apresentaram repetições de 3 UTOs em todas elas simultaneamente e outras 3 UTOs em pelo menos duas das áreas, enquanto as áreas de eucalipto (1, 2 e 6) não apresentaram repetições das UTOs percebidas (Tabela 22). Estas repetições não ajudaram a contrastar os graus de similaridades obtidos (Figura 16).

Tabela 22 – Posição de referência e valores das UTOs no gel de DGGE para o grupo γ -Proteobacteria determinado pelo software GelComparII®. Posição de referência dada pela altura da banda no gel. Área 1: eucalipto, Latossolo e Lagoa Cristal; Área 2: eucalipto, Neossolo flúvico, Lagoa Cristal; Área 3:- mata, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; Área 4: mata, Latossolo e Lagoa Cristal; Área 5: mata, Latossolo e Lagoa do Jacinto; e Área 6: eucalipto, Latossolo e Lagoa do Jacinto

Posição de Referência	Áreas					
	1	2	3	4	5	6
6					20.144	17.084
7			17.401	27.179		
9		25.913				
18	20.195					
23				24.296		13.618
31				33.541		
37				10.254		
45	8.974					
46		11.700				
47			11.341	10.510	11.717	
48						7.216
63	7.855				6.857	
65						3026
112	16.526					
114		20.676	18.408			
115				20.232	16.822	14.624
116	17.119					
118		21.076	19.166			
119					17.356	
120				20.953		14.063
140	17.677					
141		22.458				
142			20.669	20.949	17.071	
143						13.738
146	17.755					
147			13.916		18.373	
188						5.166
192		14.664				
194					8.081	
241			8.070			
264					26.318	
269					22.604	
329				17.625		
333						3.809
334	17.335					7.215
335		22.186	18.370	8.298	15.547	

3.7. PCR, DGGEa análise de similaridade e índice de diversidade para Actinobacteria e Firmicutes

A imagem obtida da eletroforese do gel de agarose dos produtos de PCR, para Firmicutes, mostra amplificação homogênea entre todas as amostras. O resultado para Actinobacteria também se apresenta homogêneo, mas com menor intensidade nas bandas (Figura 18).

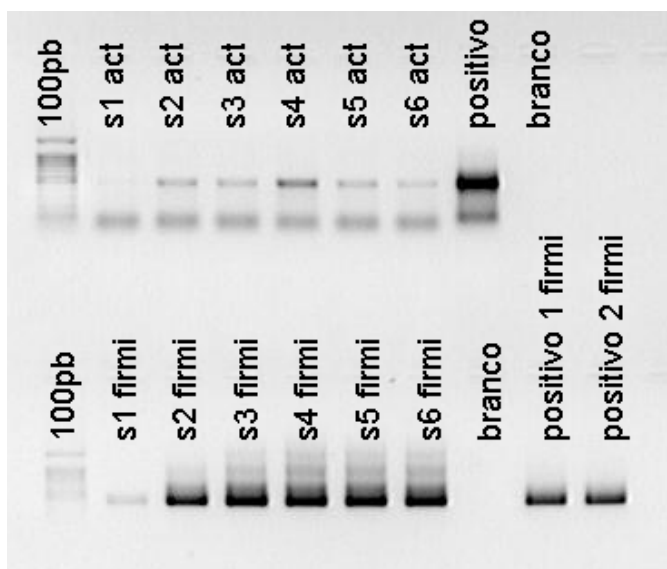


Figura 18 – Gel de agarose do resultado de PCR para Actinobacteria e Firmicutes utilizando *primers* específicos. Foram aplicados 5 μ L de cada amplificado. S1: solo de eucalipto, Latossolo e Lagoa Cristal; S2: solo de eucalipto, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; S3: solo de mata, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; S4: solo de mata, Latossolo e Lagoa Cristal; S5: solo de mata, Latossolo e Lagoa do Jacinto; e S6: solo de eucalipto, Latossolo e Lagoa do Jacinto. Branco corresponde aos reagentes da PCR sem o DNA molde. O controle positivo para Firmicutes foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Bacillus cereus* (ATCC 14579). Marcador de tamanho de 100 pb.

A presença de populações de Actinobacteria nas áreas praticamente não foi visualmente percebida, podendo significar populações pequenas indetectáveis pela sensibilidade da técnica utilizada (Figura 19).

Na pesquisa de Firmicutes somente a área 1 se apresentou da maneira citada acima, as outras bandas apresentaram pelo menos 2 bandas intensas e comuns a todas as áreas (Figura 19).

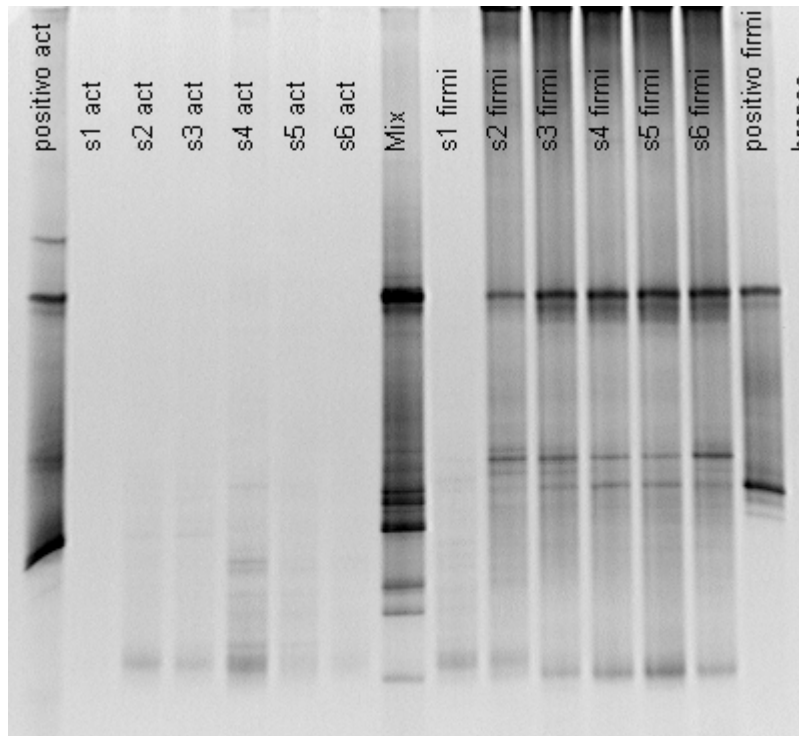


Figura 19 – Perfil eletroforético em DGGE de produtos de PCR dos fragmentos de 16S rDNA utilizando iniciadores para Actinobacteria e Firmicutes. Foram aplicados 20 μ L de cada produto da amplificação. S1: solo de eucalipto, Latossolo e Lagoa Cristal; S2: solo de eucalipto, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; S3: solo de mata, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; S4: solo de mata, Latossolo e Lagoa Cristal; S5: solo de mata, Latossolo e Lagoa do Jacinto; e S6: solo de eucalipto, Latossolo e Lagoa do Jacinto. Branco corresponde à reação de PCR sem a adição do DNA molde. O controle positivo Firmicutes foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Bacillus cereus* (ATCC 14579).

Os índices não mostraram diferença significativa em relação ao uso do solo. A média dos índices de diversidade dos solos de eucalipto foi de 1.42 e a referente aos solos de mata foi de 1.56, apresentando uma diferença entre eles de 8,97% em relação ao maior valor (Tabela 23).

Das áreas de mata, as de números 5 e 3 apresentaram os maiores índices, e a área 4 um dos menores (Figura 22).

Das áreas sob plantio de eucalipto as de número 1 e 6 foram as com os maiores índices de diversidade, quando comparados com as de mata, enquanto o da área 2 (árvores colhidas) o menor (Figura 22).

act1 (6 entries)

Dice (Tol 2.3%-2.3%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

act1

act1

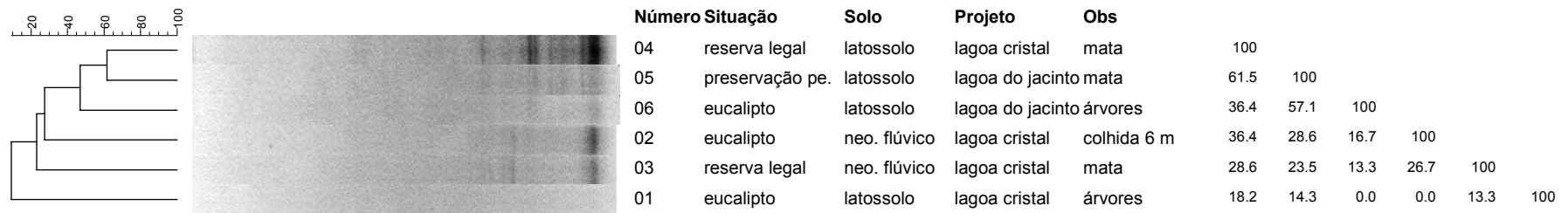


Figura 20 – Análise de similaridade para Actinobacteria com uso do *software* GelComparII®. Os números correspondem às áreas amostradas.

firmi1 (6 entries)

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

firmi1

firmi1

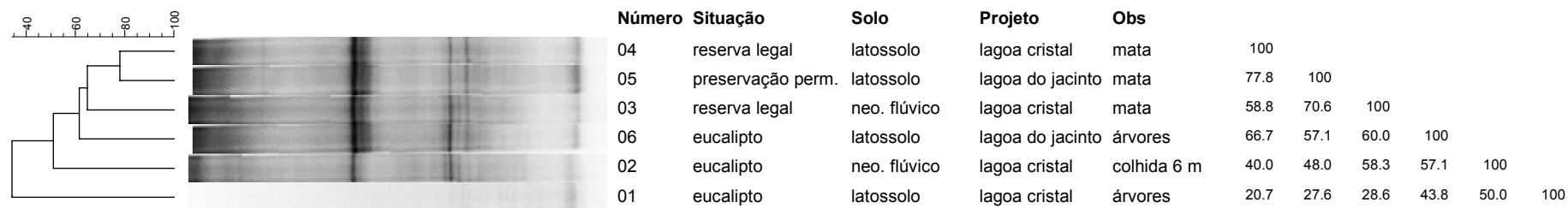


Figura 21 – Análise de similaridade para Firmicutes com uso do *software* GelComparII®. Os números correspondem às áreas amostradas.

Actinobacteria:

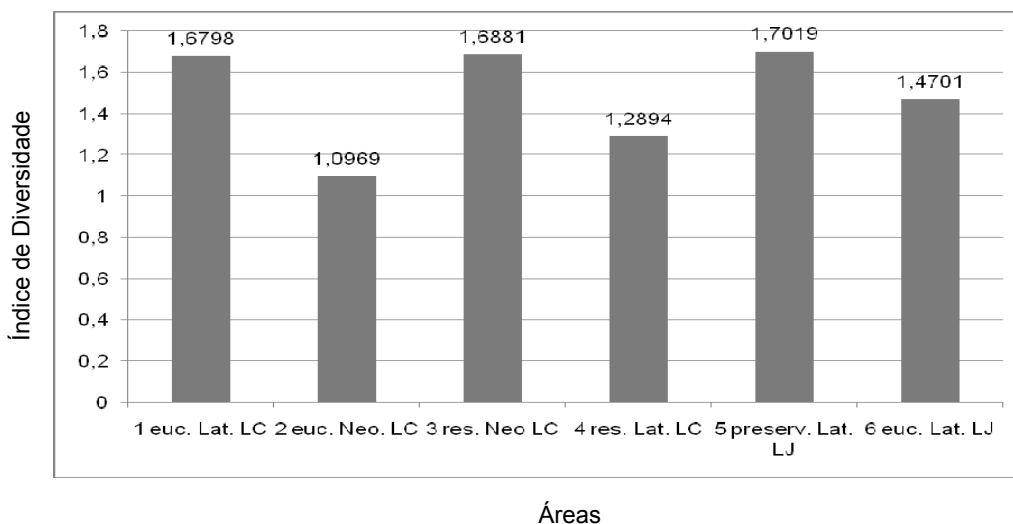


Figura 22 – Índices de diversidade de Actinobacteria e as áreas coletadas. Simbologia: euc.: eucalipto; lat.: Latossolo; neo.: Neossolo flúvico; LC: lagoa Cristal; LJ: Lagoa do Jacinto; res.: reserva legal; preserv.: preservação permanente.

Tabela 23 – Média dos índices de diversidade de Actinobacteria para as áreas de eucalipto e mata das seis amostras de solo coletadas em áreas pertencentes à CENIBRA (Celulose Nipo-Brasileira), no município de Ipaba, região do Vale do Rio Doce, em Minas Gerais, de acordo com os dados da Figura 22

Cobertura Vegetal	Média dos Índices de Diversidade
Eucalipto	1.42
Mata	1.56

A análise de similaridade agrupou as áreas 4 e 5 (mata nativa) com maiores graus de similaridade e mostrou menor grau com as áreas sob plantio de eucalipto, incluindo a área 3 (mata), a qual apresentou menor similaridade em relação às áreas 4 e 5 (Figura 20).

Os índices não mostraram diferença em relação ao tipo de solo. A média dos índices de diversidade dos solos do tipo Latossolo foi de 1.535 e a referente ao Neossolo flúvico foi de 1.392, apresentando uma diferença entre eles de 9,33% em relação ao maior valor (Tabela 25).

Tabela 24 – Unidades taxonômicas operacionais (UTOs) e seus volumes obtidos no gel de DGGE de Actinobacteria em cada área após uso do software GelComparII[®]. Área 1: eucalipto, Latossolo e Lagoa Cristal; Área 2: eucalipto, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; Área 3: mata, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; Área 4: mata, Latossolo e Lagoa Cristal; Área 5: mata, Latossolo e Lagoa do Jacinto; e Área 6: eucalipto, Latossolo e Lagoa do Jacinto. O volume corresponde à intensidade de *pixels* da banda detectada pelo programa

UTOs	Volumes					
	Áreas					
	1	2	3	4	5	6
1	248	1.216	530	1.134	59	198
2	764	441	595	1.828	1.134	822
3	995	862	260	4.779	1.117	3.296
4	294	567	763	12.144	645	463
5	608	800	187	13.213	1.526	1.987
6	434	6.700	552		1.242	3.419
7			2.553		2.823	
8			1.048		5.723	
9			5.008			

Tabela 25 – Média dos índices de diversidade de Actinobacteria para os solos das seis amostras de solo coletadas em áreas pertencentes à CENIBRA (Celulose Nipo-Brasileira), no município de Ipaba, região do Vale do Rio Doce, em Minas Gerais, de acordo com as classes Latossolo e Neossolo, de acordo com os dados da Figura 22

Classe de Solo	Média dos Índices de Diversidade
Latossolo	1.535
Neossolo	1.392

A análise da ocorrência e repetição das UTOs nas áreas para o grupo Actinobacteria não indicou similaridades entre elas. Para as áreas de mata (3, 4 e 5) somente 1 de 9 UTOs possíveis se repetiu nas 3. Este resultado aponta para uma grande diferença entre as populações de actinomicetes nestes solos (Tabela 26).

Tabela 26 – Posição de referência e valores das UTOs no gel de DGGE para o grupo Actinobacteria determinado pelo software GelComparII®. Posição de referência dada pela altura da banda no gel. Área 1: eucalipto, Latossolo e Lagoa Cristal; Área 2: eucalipto, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; Área 3: mata, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; Área 4: mata, Latossolo e Lagoa Cristal; Área 5: mata, Latossolo e Lagoa do Jacinto; e Área 6: eucalipto, Latossolo e Lagoa do Jacinto

Posição de Referência	Áreas					
	1	2	3	4	5	6
11	248					
15					59	
16						198
27			530			
32		1.216				
43	764					
47						822
49					1.134	
65			595			
74					1.117	
95			260			
100		441				
111			763			
115						3.296
125	995					
128					645	
131		862				
135				1.134		
155						463
166			187			
192			552			
214	294					
231		567				
233				1.828		
235					1.526	
256			2.553			
257		800				
273				4.779	1.242	
274						1.987
294	608		1.048			
296					2.823	
297				12.144		
322		6.700				3.419
323			5.008	13.213	5.723	
327	434					

Firmicutes:

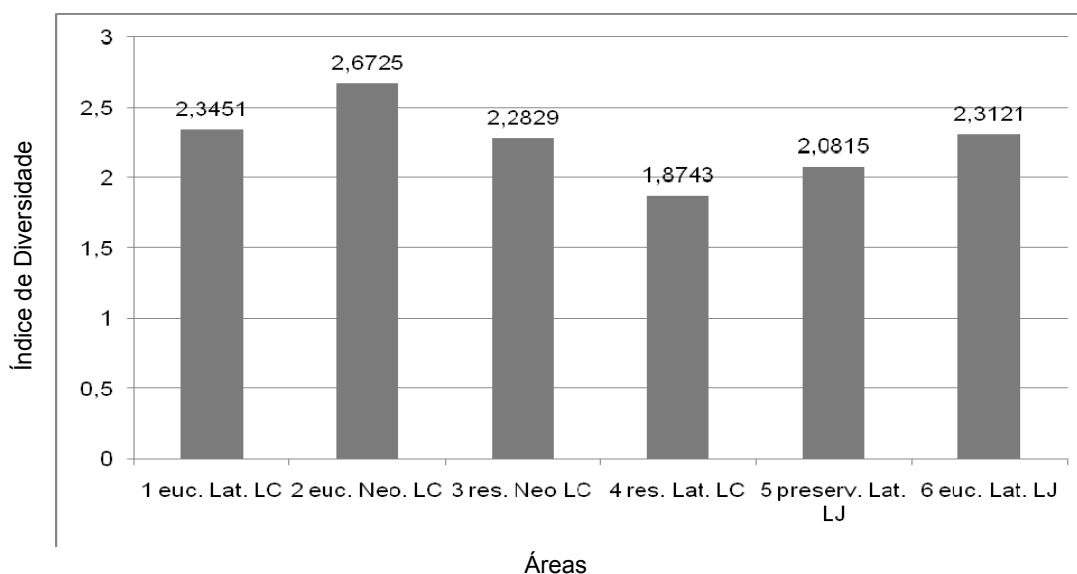


Figura 23 – Índices de diversidade de Firmicutes e as áreas coletadas. Simbologia = euc.: eucalipto; lat.: Latossolo; neo.: Neossolo flúvico; LC: Lagoa Cristal; LJ: Lagoa do Jacinto; res.: reserva legal; e preserv.: preservação permanente.

Os índices não mostraram diferença em relação ao uso do solo. A média dos índices de diversidade dos solos de eucalipto foi de 2.406 e a referente aos solos de mata foi de 2.079, apresentando uma diferença entre eles de 13,59% em relação ao maior valor (Tabela 27).

Tabela 27 – Média dos índices de diversidade de Firmicutes para as áreas de eucalipto e mata das seis amostras de solo coletadas em áreas pertencentes à CENIBRA (Celulose Nipo-Brasileira), no município de Ipaba, região do Vale do Rio Doce, em Minas Gerais, de acordo com os dados da Figura 23

Cobertura Vegetal	Média dos Índices de Diversidade
Eucalipto	2.406
Mata	2.079

As áreas 2, 1 e 6 (eucalipto) apresentaram os maiores índices, contrastando com as áreas 3, 5 e 4 (mata) que apresentaram os menores em ordem decrescente (Figura 23). Para este grupo os resultados obtidos mostram maior diversidade em áreas sob plantio de eucalipto do que em área de mata nativa (Figura 23).

Tabela 28 – Unidades taxonômicas operacionais (UTOs) e seus volumes obtidos no gel de Firmicutes em cada área após uso do *software* GelComparII®. Área 1: eucalipto, Latossolo e Lagoa Cristal; Área 2: eucalipto, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; Área 3: mata, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; Área 4: mata, Latossolo e Lagoa Cristal; Área 5: mata, Latossolo e Lagoa do Jacinto; e Área 6: eucalipto, Latossolo, Lagoa do Jacinto. O volume corresponde à intensidade de *pixels* da banda detectada pelo programa

UTOs	Volumes					
	Áreas					
	1	2	3	4	5	6
1	160	16.171	6.115	21.261	15.091	4.612
2	501	8.519	3.763	2.890	18.005	14.503
3	287	7.006	1.409	16.513	9.802	17.352
4	447	8.736	14.991	3.534	1.912	5.426
5	913	5.242	14.303	2.235	2.216	2.746
6	421	4.326	11.149	4.753	4.106	10.052
7	521	10.175	7.802	5.906	6.082	3.177
8	565	1.469	2.429	2.127	3.353	9.210
9	561	2.333	5.986	7.592	6.859	3.633
10	617	1.447	4.101		11.455	5.851
11	757	6.231	3.163			3.747
12	636	4.989	4.721			6.440
13	357	5.773				
14	868	4.787				
15	452	3.595				
16	1.099	6.434				
17	1.433	3.670				
18	2.154					
19	8.032					
20	55					

A análise de similaridade agrupou em ordem áreas de mata e depois as de eucalipto (Figura 21).

Os índices não mostraram diferença em relação ao tipo de solo. A média dos índices de diversidade dos solos do tipo Latossolo foi de 2.153 e a média referente aos solos do tipo Neossolo flúvico foi de 2.477, apresentando uma diferença entre eles de 13,08% em relação ao maior valor (Tabela 29).

Tabela 29 – Média dos índices de diversidade de Firmicutes para os solos das classes Latossolo e Neossolo das seis amostras de solo coletadas em áreas pertencentes à CENIBRA (Celulose Nipo-Brasileira), no município de Ipaba, região do Vale do Rio Doce, em Minas Gerais, de acordo com os dados da Figura 23

Classe de Solo	Média dos Índices de Diversidade
Latossolo	2.153
Neossolo	2.477

Os geis referentes a áreas de mata (3, 4 e 5) apresentaram repetição na ocorrência das mesmas UTOs de Firmicutes, apontando para uma similaridade quanto à composição das suas populações. De um máximo de 12 UTOs percebidas na área 3, 5 delas se repetem em pelo menos uma das outras duas áreas de mata. Além dessas, outras 2 UTOs se repetem somente nas áreas 4 e 5 (Tabela 30). Estas repetições reforçam os graus de similaridade obtidos pelas áreas (Figura 21).

Tabela 30 – Posição de referência e valores das UTOs no gel de DGGE para o grupo Firmicutes determinado pelo software GelComparII®. Posição de referência dada pela altura da banda no gel. Área 1: eucalipto, Latossolo e Lagoa Cristal; Área 2: eucalipto, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; Área 3: mata, Neossolo flúvico e Lagoa Cristal; Área 4: mata, Latossolo e Lagoa Cristal; Área 5: mata, Latossolo e Lagoa do Jacinto; e Área 6: eucalipto, Latossolo e Lagoa do Jacinto

Posição de Referência	Áreas					
	1	2	3	4	5	6
6		16.171				
7						4.612
15	160					
26				21.261	15.091	
29						14.503
34		8.519				
35	501					
44			6.115			
45	287	7.006				
50		8.736				
58	447					
62			3.763			
63				2.890		

Continua...

Tabela 30, Cont.

Posição de Referência	Áreas					
	1	2	3	4	5	6
79	913					
80		5.242				
93		4.326				
111	421					
117	521					
118			1.409			
139			14.991		18.005	17.352
140		10.175				
140				16.513		
145						5.426
146			14.303	3.534	9.802	
178		1.469				
189	565			2.235		
190					1.912	
191		2.333				
196	561					
206						2.746
216					2.216	
217		1.447	11.149			
220					4.106	10.052
221			7.802	4.753		
222	617	6.231				
227						3.177
228			2.429			
229		4.989				
232	757					
235				5.906	6.082	9.210
236			5986			
237	636	5.773				
245					3353	3633
246		4.787	4.101	2.127		
248	357					
250					6.859	
254						5.851
264	868					
265			3.163			3.747
269	452					
276	1.099					
282		3.595				
287	1.433					
297	2.154					

Continua...

Tabela 30, Cont.

Posição de Referência	Áreas					
	1	2	3	4	5	6
322		6.434				
324	8.032					
328		3.670			11.455	6.440
329			4.721	7.592		
352	55					

Nas áreas sob cultivo de eucalipto (1, 2 e 6) não houve ocorrências de UTOs equivalentes. Entre as áreas 1 e 2, de um total de 20 UTOs, somente três se mostraram equivalentes nos geis (Tabela 30).

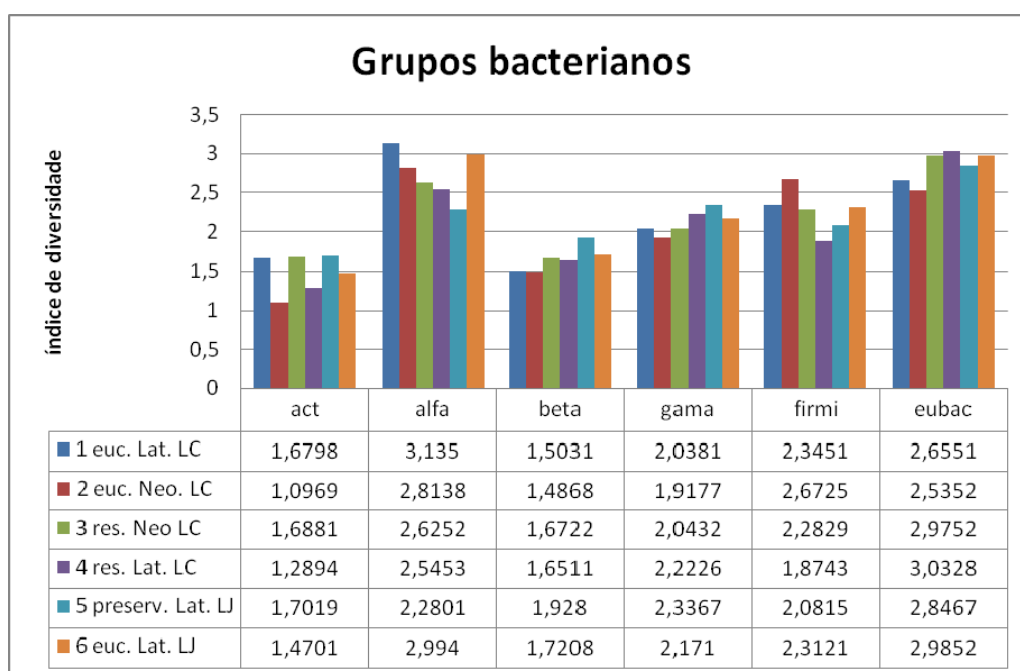


Figura 24 – Gráfico comparativo dos índices de diversidade dos grupos de micro-organismos nas áreas estudadas. Simbologia = euc.: eucalipto; lat.: Latossolo; neo.: Neossolo flúvico; LC: Lagoa Cristal; LJ: Lagoa do Jacinto; res.: reserva legal; e preserv.= preservação permanente.

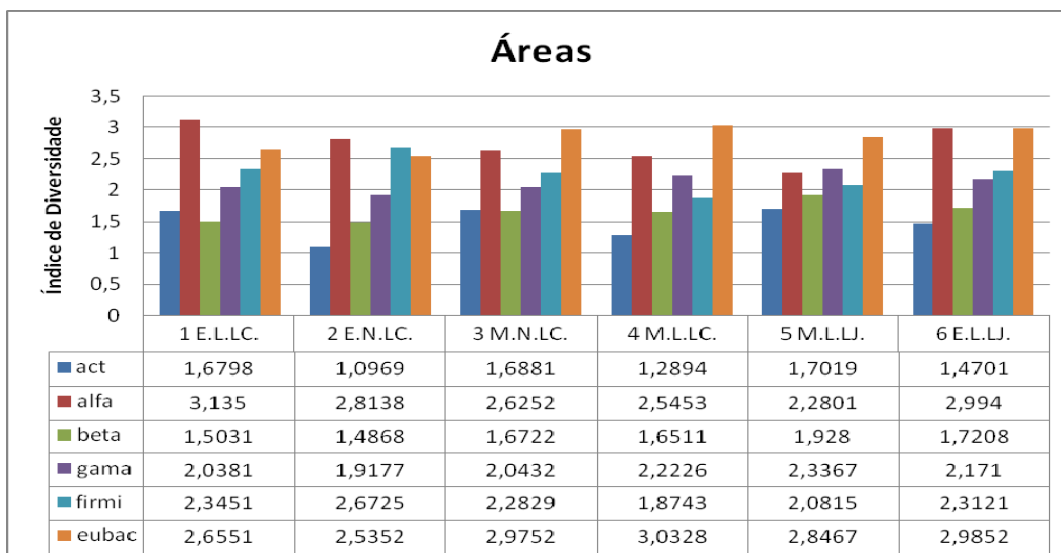


Figura 25 – Gráfico comparativo das áreas estudadas e índice de diversidade dos grupos de micro-organismos. Simbologia = euc.: eucalipto; lat.: Latossolo; neo.: Neossolo flúvico; LC: Lagoa Cristal; LJ: Lagoa do Jacinto; res.: reserva legal; e preserv.: preservação permanente.

Os grupos com os maiores índices de diversidade, independentemente das características das áreas, foram respectivamente: α -Proteobacteria, Firmicutes e γ -Proteobacteria, à semelhança do resultado obtido por Silveira (2006), ao caracterizar populações dominantes de Acidobacteria, Actinobacteria e Proteobacteria em estudo de solo sob cultivo de eucalipto e sob mata nativa no estado de São Paulo.

A presença de muitas UTOs com baixa densidade populacional significando condições adversas que não permitem o desenvolvimento das populações.

4. CONCLUSÕES

Nas áreas 1, 2, 3, 4 e 6 os maiores índices de diversidade corresponderam à α -Proteobacteria, filo com o segundo maior índice na área 5. A ocorrência desse filo foi constatada como dominante em todos os solos, Latossolo e Neossolo flúvico, e sob as coberturas vegetais de mata nativa e eucalipto.

A diversidade em Firmicutes e γ -Proteobacteria foi expressiva, porém em Actinobacteria e β -Proteobacteria a diversidade foi menor em todas as áreas sob estudo.

As médias dos índices de diversidade de filios considerando as classes de solo foram maiores em Latossolo, excetuando-se a de Firmicutes, em que a maior diversidade foi em solo sob eucalipto.

O maior índice de diversidade de Eubacteria em solos sob mata do que nos sob eucalipto corrobora a afirmativa de que a cobertura vegetal determina alterações na diversidade da comunidade microbiana.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAF – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PROUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. 2008. Disponível em: <<http://www.abraflor.org.br/estatisticas/ABRAF08-BR.asp>>. Acesso em: 10 Fev. 2009.

AMANN, R.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Review*, v. 59, p. 143-169, 1995.

ASAKAWA, S.; KIMURA, M. Comparison of bacterial community structures at main habitats in paddy field ecosystem based on DGGE analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 40, p. 1322-1329, 2008.

BECK, T.; CAPRIEL, P.; BORCHERT, H.; BRANDHUBER, R. Die mikrobielle Biomass in landwirtschaftlich genutzten Böden. *Agribiology*, v. 48, p. 74-82, 1995.

BLACKWOOD, C.; OAKS, A.; BUYER, J. Phylum- and class-specific PCR primers for general microbial community analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 10, p. 6193-6198, 2005.

BRACELPA – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CELULOSE E PAPEL. 2008. Disponível em: <<http://www.bracelpa.org.br>>. Acesso em: 19 Ago. 2008.

BRONS, J.; van ELSAS, J. Analysis of Bacterial communities in soil by use of denaturing gradient gel electrophoresis and clone libraries, as influenced by different reverse primers. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, n. 9, p. 2717-2727, 2008.

BROSIUS, J.; DULL, T. J.; SLEETER, D. D.; NOLLER, H. F. 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, v. 148, p. 107-127, 1981.

- CENIBRA – CELULOSE NIPO-BRASILEIRA S.A. 2008. Disponível em: <<http://www.cenibra.com.br>>. Acesso em: 19 Ago. 2008.
- COLEMAN, D.; WHITMAN, W. Linking species richness, biodiversity and ecosystem function in soil systems. *Pedobiologia*, v. 49, p. 479-497. 2005.
- COUTINHO, H. D.; OLIVEIRA, V.; MANFIO, G.; ROSADO, A. Evaluating the microbial diversity of soil samples: methodological innovations. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 71, n. 3, p. 491-503, 1999.
- DONG, X.; HUAY-YING, Y.; DE-YOUNG, G.; CHANG-YOUNG, H. Soil microbial community structure in diverse land use systems: A comparative study using Biolog, DGG and PLFA analysis. *E. Pedosphere*, v. 18, n. 5, p. 653-663, 2008.
- DUNBAR, J.; TAKALA, S.; BARNS, S.; DAVIS, J.; KUSKE, C. Levels of Bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rDNA gene cloning. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, p. 1662-1669, 1999.
- EMBLEY, T.; STACKEBRANDT, E. Species in practice: exploring uncultured prokaryote diversity in natural samples. In: CLARIDGE, M.; DAWAH, H.; WILSON, M. (Org.) *Species: the units of biodiversity*. United Kingdom: Chapman and Hall, 1997. p. 61-81.
- FIERER, N.; BRADFORD, M. A.; JACKSON, R. Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology*, v. 88, n. 6, p. 1354-1364, 2007.
- FREY, S.; DRIJBER, R.; SMITH, H.; MELILLO, J. Microbial biomass, functional capacity, and community structure after 12 years of soil warming. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 40, p. 2904-2907, 2008.
- GELSOMINO, A.; CACCO, G. Compositional shifts of Bacterial groups in a solarized and amended soil as determined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 38, p. 91-102, 2006.
- GOMES, N.; HEUER, H.; SCHÖNFELD, J.; COSTA, R.; MENDONÇA-HAGLER, L.; SMALLA, K. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. *Plant and Soil*, v. 232, p. 167-180, 2001.
- HENDRIX, P.; ODUM, E.; CROSSLEY JR., D.; COLEMAN, D. Horseshoe bend research: old-fields studies (1965-1975) and agroecosystem studies (1976-2000). In: BARRET, G.; BARRET, T. (Org.). *Holistic Science: the Evolution of the Georgia Institute of Ecology (1940-2000)*. Nova York: Taylor & Francis, 2001. p. 164-177.
- HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E. Analysis of Actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, n. 8, p. 3233-3241, 1997.

- HOFMAN, J.; BEZCHLEBOVÁ, J.; DUSEK, L.; DOLEZAL, L.; HOLOUBEK, I.; AND-L, P. *et al.* Novel approach to monitoring of the soil biological quality. *Environment International*, v. 28, n. 8, p. 771-778, 2003.
- HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B.; PACE, N. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal Bactériology*, v. 180, p. 4765-4774, 1998.
- JACKSON, C.; LIEW, K. Structural and functional changes with depth in microbial communities in a tropical Malaysian peat swamp forest. *Microbial Ecology*, DOI 10.1007/s00248-008-9409-4, 2008.
- JANGID, K.; WILLIAMS, M.; FRANZLUEBBERS, A.; SANDERLIN, J.; REEVES, J.; JENKINS, M. *et al.* Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 40, p. 2843-2853, 2008.
- JANSSEN, P. Identifying the dominant soil Bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, n. 3, p. 1719-1728, 2006.
- KIRK, J.; BEAUDETTE, L.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J.; LEE, H. *et al.* Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, v. 58, p. 169-188, 2004.
- LOREAU, M. Microbial diversity, producer-decomposer interaction and ecosystem processes: a theoretical model. *Proceedings: Biological Science*, v. 268, p. 303-309, 2001.
- MACRAE, A. The Use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 31, p. 77-82, 2000.
- MATSON, P. A.; PARTON, W. J.; POWER, A. G.; SWIFT, M. J. Agricultural intensification and ecosystem properties. *Science*, v. 277, p. 504-508, 1997.
- MCCAIG, A.; GLOVER, L.; PROSSER, J. Numerical Analysis of grassland Bacterial community structure under different land management regimens by using 16S ribosomal DNA sequence data and denaturing gel electrophoresis banding patterns. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, p. 4554-4559, 2001.
- MUIZER, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 2, p. 317-322, 1999.
- MUYZER, G.; WAAL, E.; UITTERLINDEN, A. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, n.3, p. 695-700, 1993.

- NUBEL, U., ENGELEN, B., FELSKE, A., SNAIDR, J., WIESHUBER, A., AMANN, R., et al. (1996). Sequence heterogeneties of genes encoding 16S rRNA in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gl electrophoresis. *Journal of Bactériology*, 178, pp. 5636-5643.
- NUSSLEIN, K.; TIEDJE, J. Soil Bacterial community shift correlated with change from forest to pasture vegetation in a tropical soil. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 8, p. 3622-3626, 1999.
- ØVREAS, L.; TORSVIK, V. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microbial Ecology*, v. 36, p. 303-315, 1998.
- PEREIRA, R. M.; SILVEIRA, E. L.; SCAQUITTO, D. C.; PEDRINHO, E. A. N.; VAL-MORAES, S. P.; WICKERT, E.; CARARETO-ALVES, L. M.; LEMOS, E. G. M. Molecular characterization of Bacterial populations of different soils. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 37, p. 439-447, 2006.
- PLATEFORME GENOSOL. 2008. Disponível em: <http://www2.dijon.inra.fr/plateforme_genosol/en/obj_missions.php>. Acesso em: 17 Fev. 2009.
- RAPPÉ, M.; GIOVANNONI, S. The unculture microbial majority. *Annual Review Microbiology*, v. 57, p. 369-394, 2003.
- RODRIGUES, W. DivEs – Diversidade de espécies. Versão 2.0. *Software e Guia do Usuário*. 2005. Acesso em: 15 Nov. 2008. Disponível em: <<http://www.esbras.bio.br>>.
- ROESH, L. F. W.; FULTHORPE, R. R.; RIVA, A.; CASELLA, G.; HADWIN, A. K. M.; KENT, A. D.; DAROUB, S. H.; CAMARGO, F. A. O.; FARMERIE, W. G.; TRIPLETT, E. W. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *The ISME Journal*, v. 1, p. 283-290, 2007.
- ROSADO, A.; DUARTE, G. Utilização de eletroforese em gel com gradientes de desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura (TGGE) para estudar diversidade microbiana. In: MELLO, I. (Org.). *Genética e melhoramento de micro-organismos* São Paulo: Edusp, 2000. p. 97-127.
- ROSADO, A.; DUARTE, G.; MENDONÇA-HAGLER, L. A moderna microbiologia do solo: Aplicação de técnicas de biologia molecular. In: J. Siqueira, F. Moreira, A. Lopes, L. Guilherme, V. Faquin, A. Frutini-Neto, et al., *Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas*. Viçosa, Lavras: SBCS, UFLA/DCS, 1999. p. 429-448
- SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Toward a census of bactéria in soil. *PLOS Computational Biology*, v. 2, p. 786-793, 2006.
- SHANNON, C. A mathematical theory of communication. *Bell System Technology Journal*, v. 27, p. 379-423, p. 623-656, 1948.

SILVEIRA, E.; PEREIRA, R.; SCAQUITTO, D.; PEDRINHO, E.; MORAES, S.; WICKERT, E. *et al.* 2006. Bacterial diversity of soil under eucalyptus assessed by 16S rDNA sequencing analysis. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 41, n. 10, p. 1507-1516.

SMITH, E.; LEEFLANG, P.; GOMMANS, S.; van den BROEK, J.; van MIL, S.; WERNARS, K. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the Bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 5, p. 2284-2291, 2001.

TANGJANG, S. *et al.* Microbial population dynamics of soil under traditional agroforestry systems in northeast India. *Research Journal of Soil Biology*, v. 1, n. 1, p. 1-07, 2009.

TORSVIK, V. OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: From genes to ecosystems bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, v. 5, p. 240-245, 2002.

TÓTOLA, M.; CHAER, G. Micro-organismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade do solo. In: ALVAREZ, V.; SCHAEFER, C.; BARROS, N. J. de MELLO; DA COSTA, L. (Org.). *Tópicos em Ciências do Solo* Viçosa, MG: SBCS-Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, 2002, p. 195-276.

UPCHURCH, R.; CHIU, C.; EVERETT, K.; DYSZYNSKI, G.; COLEMAN, D.; WHITMAN, W. Differences in the composition and diversity of Bacterial communities from agricultural and forest soils. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 40, p. 1294-1305, 2008.

USHIO, M.; WAGAI, R.; BALSER, T.; KITAYAMA, K. Variations in the soil microbial community composition of a tropical montane forest ecosystem: Does tree species matter? *Soil Biology & Biochemistry*, v. 40, p. 2699-2702, 2008.

van BRUGGEN, A.; SEMENOV, A. In search of biological indicators for soil health and disease suppression. *Applied Soil Ecology*, v. 15, p. 13-24, 2000.

WEISBURG, W.; BARNES, S.; PELLETIER, D.; LANE, D. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

WHITMAN, W.; COLEMAN, D.; WIEBE, W. Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 95, p. 6578-6583, 1998.

WOLTERS, V.; JÖERGENSEN, R. 1991. Microbial carbon turnover in beach forest soils at different stages of acidification. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 23, p. 897-902.

WRIGHT, C. J.; COLEMAN, D. C. Responses of soil microbial biomass, nematode trophic groups, N-mineralization, and litter decomposition to disturbance events in Southern Appalachians. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 34, p. 13-25, 2002.