

*Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento*

# ***Boletim de Pesquisa 62 e Desenvolvimento***

*ISSN 1678-0892  
Dezembro, 2004*

## **Impacto à Diversidade Microbiana (IDM) Uma Estratégia para Incorporação de Resultados de Análises Moleculares de Biodiversidade em Estudos Integrados de Qualidade do Solo**



**Embrapa**  
Solos

**República Federativa do Brasil**

*Luiz Inácio Lula da Silva*

Presidente

**Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

*Roberto Rodrigues*

Ministro

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**

**Conselho de Administração**

*Luís Carlos Guedes Pinto*

Presidente

*Clayton Campanhola*

Vice-Presidente

*Alexandre Kalil Pires*

*Ernesto Paterniani*

*Hélio Tollini*

*Marcelo Barbosa Saintive*

Membros

**Diretoria-Executiva**

*Clayton Campanhola*

Diretor-Presidente

*Gustavo Kauark Chianca*

*Herbert Cavalcante de Lima*

*Mariza Marilena T. Luz Barbosa*

Diretores-Executivos

**Embrapa Solos**

*Celso Vainer Manzatto*

Chefe Geral

*Alúísio Granato de Andrade*

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

*David Dias Moreira Filho*

Chefe Adjunto de Administração



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Centro Nacional de Pesquisa de Solos  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

ISSN 1678-0892

Dezembro, 2004

## ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 62***

### **Impacto à Diversidade Microbiana (IDM) uma estratégia para incorporação de resultados de análises moleculares de biodiversidade em estudos integrados de qualidade do solo**

*Heitor Luiz da Costa Coutinho*

*Marcela Cristina Rosas Aboim*

*Alexandre Soares Rosado*

*Joyce Costa Barbosa*

Rio de Janeiro, RJ  
2004

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Solos**

Rua Jardim Botânico, 1.024 Jardim Botânico. Rio de Janeiro, RJ

Fone:(21) 2274.4999

Fax: (21) 2274.5291

Home page: [www.cnps.embrapa.br](http://www.cnps.embrapa.br)

E-mail (sac): [sac@cnps.embrapa.br](mailto:sac@cnps.embrapa.br)

**Supervisor editorial:** *Jacqueline Silva Rezende Mattos*

**Normalização bibliográfica:** *Cláudia Regina Delaia*

**Revisão de Português:** *André Luiz da Silva Lopes*

**Editoração eletrônica:** *Pedro Coelho Mendes Jardim*

**1ª edição (2004): 100 exemplares**

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

---

Impacto à diversidade microbiana (IDM): uma estratégia para incorporação de resultados de análises moleculares de biodiversidade em estudos integrados de qualidade do solo / Heitor Luiz da Costa Coutinho... [et al.]. - Rio de Janeiro : Embrapa Solos, 2004.

27 p.. - (Embrapa Solos. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento; n. 62)

ISSN 1678-0892

1. Qualidade do Solo. 2. Biodiversidade – Mata Atlântica. 3. IDM (Impacto à Diversidade Microbiana). I. Coutinho, Heitor da Costa. II. Aboim, Marcela Cristina Rosas. III. Rosado, Alexandre Soares. IV. Barbosa, Joyce Costa. V. Embrapa Solos (Rio de Janeiro). VI. Série.

---

CDD (21.ed.) 631.4

© Embrapa 2004

# Sumário

<b>Introdução</b> .....	9
<b>Material e Métodos</b> .....	11
Descrição da Área .....	11
Tratamentos .....	11
Amostragem do Solo .....	12
Extração do DNA total dos microrganismos do solo .....	12
Amplificação Genômica (PCR).....	12
“Impressões Digitais” Genéticas do Solo (DGGE) .....	12
Interpretação dos Géis de DGGE .....	13
Determinação do Impacto à Diversidade Microbiana (IDM) .....	13
Atributos Analisados .....	15
Análises de Correlação .....	15
<b>Resultados e Discussão</b> .....	16
<b>Conclusões</b> .....	23
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	25

# **Impacto à Diversidade Microbiana (IDM) uma estratégia para incorporação de resultados de análises moleculares de biodiversidade em estudos integrados de qualidade do solo**

---

*Heitor Luiz da Costa Coutinho*

*Marcela Cristina Rosas Aboim*

*Alexandre Soares Rosado*

*Joyce Costa Barbosa*

## **Resumo**

Qualidade do solo é um conceito, desenvolvido a partir da década de 1980 e aprimorado na década seguinte, que considera não apenas a função do solo em prover nutrientes e substrato físico para o crescimento de plantas, mas também sua capacidade de regular o clima e a hidrologia do ecossistema onde se insere, e funcionando desta forma harmoniosa para atender não só as necessidades das gerações presentes, mas também das gerações futuras da humanidade. Assim, qualidade do solo é um conceito intimamente ligado ao de sustentabilidade, de onde se conclui que não há sistema de uso da terra sustentável se a qualidade do solo se deteriora ao longo do tempo. O monitoramento dos impactos, positivos ou negativos, do uso da terra sobre a qualidade do solo demanda a utilização de indicadores baseados em parâmetros químicos, físicos e biológicos do solo. A diversidade microbiana do solo, reconhecidamente relevante para o funcionamento deste valioso recurso natural, tem sido cada vez mais investigada em estudos de qualidade do solo, com o emprego de técnicas moleculares para sua elucidação. No entanto, estas técnicas apresentam resultados na maioria das vezes de aspecto qualitativo, revelando a presença ou ausência de grupos microbianos na matriz do solo, o que dificulta o emprego destes dados em análises integradas com outros parâmetros do solo, como teores de nutrientes, matéria orgânica, ou ainda índices do estado de agregação do solo. Neste trabalho apresentamos uma estratégia metodológica para incorporar dados resultantes da técnica de PCR/DGGE, que vem sendo amplamente utilizada

em análises de diversidade microbiana a partir de DNA extraído diretamente de amostras de solo, em estudos de qualidade do solo. A partir dos perfis de bandas resultantes dos géis de eletroforese desnaturante, foram calculados valores chamados de IDM, Índice de Impacto à Diversidade Microbiana, que apresentaram correlações positivas e negativas significativas com diversos parâmetros já consagrados em estudos de qualidade do solo. A estratégia foi aplicada com sucesso em solos sob diferentes pressões de uso agrícola, e estágios de sucessão vegetal, incluindo uma mata clímax, coletados de uma propriedade sob sistema de agricultura migratória de base familiar na região Serrana do Estado do Rio de Janeiro.

**Termos de indexação:** qualidade do solo; diversidade microbiana; DGGE; Mata Atlântica; agricultura migratória.

# **Microbial Diversity Impact (IDM): a strategy for incorporating results from molecular analyses of biodiversity into integrated studies of soil quality**

---

## **Abstract**

The concept of soil quality, developed during the 1980's and improved along the following decade, that incorporates not only the soil's ability to function as a provider of nutrients and physical substrate to plant growth, but also its ability to regulate the hydrology and climate of the ecosystem, functioning harmoniously to attend the needs of the present as well as of future human generations. Soil quality is a concept closely linked to that of sustainability, and therefore there can be no sustainable land use system if its soil quality degrades over time. Monitoring positive and negative land use impacts over soil quality demands the use of indicators based on soil chemical, physical, and biological parameters. Soil microbial diversity, knowingly relevant to the functioning of this precious natural resource, has been increasingly investigated in soil quality studies, by the use of molecular techniques. However, most of these techniques render qualitative results, revealing presence or absence of microbial groups in the soil matrix, hampering their use in integrated analysis with other soil parameters, such as nutrient and organic matter contents, or soil aggregation indices. In this article we present a novel methodological framework, incorporating data derived of the PCR/DGGE technique, that is increasingly being adopted worldwide to analyse microbial diversity on soil extracted DNA. The IDM (Microbial Diversity Impact Index) were calculated taking into account the band profiles generated in the denaturing electrophoretic gels, shoed positive and negative significant correlations with several other soil quality parameters. This framework was



successfully applied to soils under diverse land use pressures, including forest succession stages, sampled from a family-based shifting cultivation system in the mountainous region of the Atlantic Rainforest in the State of Rio de Janeiro.

**Index terms:** soil quality; microbial diversity; DGGE; Atlantic Rainforest; shifting cultivation.

## Introdução

O solo é um recurso natural essencial para a vida no planeta, apresentando uma combinação de propriedades biológicas, físicas e químicas, que contribuem para suas funções ecossistêmicas. Devido à complexidade das interações entre estas propriedades, o grau de dificuldade intrínseco à interpretação sobre a qualidade de um solo é muito grande (Knoepp et al., 2000).

Nos últimos 10 anos várias definições têm sido apresentadas para “qualidade do solo” (Arshad & Martin, 2002). Doran (2002) definiu qualidade e saúde do solo como a sua capacidade de “exercer funções, como um sistema vital, nos limites dos ecossistemas naturais ou agrícolas, para sustentar a produtividade de plantas e animais, manter ou aumentar a qualidade do ar e da água, e promover a saúde de plantas e animais”. Saúde do solo é sinônimo de sustentabilidade e qualidade do solo inclui componentes que são afetados por decisões referentes ao uso e manejo agrícola (Doran & Zeis, 2000).

Há uma crescente demanda por indicadores de qualidade do solo, e pela definição de limites críticos (valores limiares, ou “threshold values”), para o funcionamento equilibrado dos ecossistemas. Indicadores de qualidade do solo são essenciais para monitorar impactos, positivos ou negativos, de fenômenos naturais ou de ações antrópicas, como é a atividade agrícola, e o descarte de resíduos industriais, hospitalares, domésticos, ou até bélicos, no caso da fabricação ou uso de armamentos tóxicos (biológicos, químicos ou nucleares) (Knoepp et al. 2000; Arshad & Martin, 2002).

No caso dos indicadores para avaliar o impacto de atividades agrícolas, há dificuldades quanto à definição dos parâmetros capazes de atestar o grau de qualidade do solo (Zilli et al., 2003). Em nossa visão, estes seriam condicionados pelas condições biofísicas do ecossistema analisado (tipo de solo, clima, cobertura vegetal, geomorfologia, por ex.). Portanto, preconizamos que sejam definidos os indicadores de qualidade do solo e seus valores limiares para cada sistema de produção agrícola predominante nas diferentes eco-regiões do País. Esta definição serviria como base para programas de monitoramento e certificação de qualidade ambiental.

Os indicadores podem ser classificados, conforme os parâmetros de qualidade do solo, em: físicos, químicos e biológicos. Alguns indicadores químicos e físicos (capacidade de troca catiônica, teor de carbono orgânico, e estabilidade de agregados, por exemplo) já são amplamente utilizados em estudos de qualidade do solo,

em função de sua relativa facilidade analítica, sendo atividades de rotina em diversos laboratórios de análise de solo. Os indicadores biológicos, por sua vez, são menos aplicados em função de maiores dificuldades analíticas e da alta variabilidade espacial e temporal, que os caracterizam, refletindo uma maior sensibilidade a alterações ambientais (Powlson et al., 2001).

Exatamente por isto, um conjunto de indicadores chave para um determinado agroecossistema deve incluir parâmetros biológicos, pois são capazes de refletir o fluxo de materiais e elementos do solo, que são transferidos entre grupos de organismos e também entre o solo e outros componentes do meio ambiente (Filip, 2002).

Os indicadores biológicos mais utilizados (respiração e biomassa microbianas, e diversidade da macrofauna) representam aspectos diferentes da qualidade do solo em diferentes ecossistemas. Seu monitoramento já permite a avaliação de três funções básicas: desenvolvimento da estrutura do solo; estoque e ciclagem de nutrientes; e, atividade biológica decompositora (ciclo do carbono) (Knoepp et al., 2000). A diversidade microbiana do solo é o parâmetro que tem sido menos utilizado como indicador, apesar de sua reconhecida relevância como agente dos principais processos ecológicos relacionados à ciclagem de nutrientes, produção de gases do efeito estufa e biodegradação de xenobióticos. Isto porque a maioria dos estudos de diversidade microbiana em ecossistemas complexos como o solo são prejudicados pela maioria de microrganismos que não são cultiváveis (algo em torno de 95%; Bakken, 1995), e pela falta de sensibilidade dos métodos de análise microbiológica clássicos. Estes dependem do isolamento, purificação e caracterização dos microrganismos do solo em laboratório, um processo tedioso, limitado quanto ao número de amostras que podem ser processadas por experimento, e com resultados pouco representativos (Coutinho et. al., 1999; Powlson et. al, 2001; Martin-Laurent et al., 2001).

A diversidade bacteriana total pode ser descrita pela diversidade de espécies (ou taxonômica), genética, e funcional (Trevors, 1995). O desenvolvimento das técnicas de biologia molecular possibilitou um avanço significativo das avaliações de diversidade genotípica das comunidades microbianas do solo, uma vez que o viés do cultivo seletivo é eliminado do processo (Torsvik & Øvreås, 2002). No entanto, os trabalhos encontrados na literatura científica carecem de análises mais aprofundadas sobre as interações entre a diversidade microbiana e os demais parâmetros, principalmente devido às dificuldades em transformar resultados de

análises moleculares em valores numéricos com significado ecológico, que possibilitem análises estatísticas integradas.

O presente trabalho tem como objetivo apresentar uma metodologia para integrar os dados de diversidade microbiana obtidos por ferramentas de biologia molecular (PCR – reação em cadeia da polimerase - e DGGE – eletroforese em gel de gradiente desnaturante) a outros parâmetros de qualidade do solo, através de ferramentas fornecidas pela bioestatística, mais especificamente estatística multivariada. A metodologia foi aplicada no estudo da qualidade do solo de um sistema de produção do tipo “agricultura migratória” de caráter familiar, na região Serrana do Estado do Rio de Janeiro.

## Material e Métodos

### Descrição da Área

Este trabalho foi realizado na propriedade Sítio da Cachoeira, localizada no Município de Bom Jardim, RJ, Brasil (22° 09'62" S e 42° 17' 14" W, altitude média 900 m), onde se adota um sistema de agricultura migratória, caracterizado pela divisão da propriedade em glebas, e o cultivo de culturas anuais em rotação (inhame, milho e feijão) durante um período de aproximadamente 3 anos, sendo depois deixadas em pousio, quando ocorre o crescimento de vegetação de capoeira primária. A reincorporação das glebas ao sistema de produção ocorre, tradicionalmente, aproximadamente 7 anos após o início do pousio. Recentemente este período de pousio tem sido encurtado, devido à atuação da fiscalização ambiental, que autua os produtores que desmatam capoeiras com mais de 4 anos de pousio, uma vez que as árvores com esta idade, se desenvolvendo em solos previamente adubados pela atividade agrícola, alcançam dimensões superiores às permitidas para um corte sem licenciamento (DAP < 10cm). A área de estudo inclui ainda fragmentos florestais de Mata Atlântica em estágios sucessionais distintos, e glebas com culturas perenes.

### Tratamentos

Os tratamentos analisados foram: café (Cf), pasto (Pa), banana (Ba), cultivo 1 ano (C1), cultivo 2 anos (C2), cultivo 3 anos (C3), pousio 1 ano (P1), pousio 3 anos (P3), pousio 5 anos (P5), mata 15 anos (M15), mata 30 anos (M30), mata > 70 anos (M > 70).

## Amostragem do Solo

Amostras indeformadas e deformadas do solo foram coletadas em janeiro de 2000, da profundidade de 0-5 cm. Como todos os tratamentos localizavam-se em encostas, duas linhas imaginárias os dividiram em três partes, ou terços, denominados superior, médio e inferior. Seis sub-amostras, distribuídas ao acaso pela superfície do terreno, compondo uma amostra composta, foram coletadas de cada terço, de cada um dos 12 tratamentos, totalizando 36 amostras compostas. As amostras submetidas à extração de DNA foram refrigeradas em isopor com gelo a partir do momento da coleta até o final do dia, quando foram congeladas e permaneceram a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a realização das extrações.

## Extração do DNA total dos microrganismos do solo

A extração foi feita segundo o protocolo do “FastDNA® SPIN Kit for Soils” da Bio 101, Inc., que consiste da lise química e mecânica das células microbianas presentes nas suspensões do solo, seguido da purificação das moléculas de DNA (ácido desoxirribonucléico) liberados das células lisadas.

## Amplificação Genômica (PCR)

Um fragmento do gene que codifica a subunidade beta da RNA polimerase – *rpoB* foi utilizado como marcador genético universal para o reino Eubactéria. Foram utilizados os iniciadores (“primers”) 1698f e 2041r, que reconhecem os flancos da região do gene *rpoB*. As condições das reações de PCR e as sequências dos iniciadores foram descritas por Peixoto et al. (2002).

## “Impressões Digitais” Genéticas do Solo (DGGE)

Os produtos de PCR, contendo fragmentos do gene *rpoB* derivados de uma amostra representativa das populações bacterianas dominantes nos solos analisados, foram separados em géis com gradiente de desnaturação. Foi utilizado uma unidade DGGE da Bio-Rad, e os géis foram preparados com 6% (wt/vol) de poliacrilamida e 1x TAE. Foi utilizado um gradiente de 35% - 65% de desnaturantes (uréia e formamida). O tempo de eletroforese foi de 18 horas a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  e 75V. Os géis foram corados por 40 minutos com SYBER Green I, observados em U.V. 366nm e suas imagens digitalizadas pelo sistema Storm 860 (Amersham).

## Interpretação dos Géis de DGGE

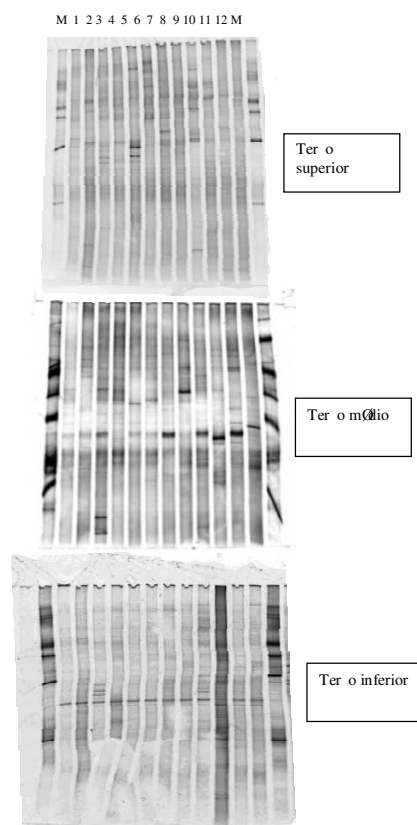
Os géis de DGGE, contendo padrões de bandas semelhantes a códigos de barras representando a diversidade genotípica presente na amostra aplicada, foram analisados através da construção de matrizes binárias de presença e ausência de bandas, segundo Kozdrój & van Elsas (2001) (Figura 2). Esta técnica adota a premissa de que cada banda visualizada representa um genótipo.

Foram gerados 3 géis, cada um representando um dos terços dos tratamentos (superior, médio e inferior), e contendo 1 amostra de cada tratamento. As amostras foram aplicadas na mesma sequência em cada gel. Para a obtenção de uma matriz que refletisse simultaneamente as 3 repetições, os géis foram dispostos em uma sequência vertical, para que cada coluna contivesse as 3 repetições de padrões de bandas de cada tratamento. Assim, a última banda presente em um padrão de um determinado tratamento em um dos géis foi seguido da primeira banda do padrão do mesmo tratamento do gel de outra repetição, e assim por diante (ver Figura 1). Esta estratégia realça as reais similaridades e dissimilaridades entre os tratamentos, uma vez que presenças ou ausências de bandas devido a artefatos do PCR ou do DGGE têm seus efeitos diluídos na análise de agrupamento. Desta forma, foi construída uma única matriz para os 3 géis, sendo registrados as presenças e ausências de bandas como 1 e 0, respectivamente. O número de bandas variou de 41 a 79 entre as amostras analisadas. A matriz binária foi submetida à análise de agrupamento (*clustering*) com auxílio do programa STATISTICA 5.0. Foi utilizado para o cálculo da distância métrica, o coeficiente de *Pearson* e como método de aglomeração, o UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Average*). Esta metodologia foi possível porque os três géis foram obtidos seguindo o mesmo protocolo, com o mesmo marcador eletroforético, sendo as amostras aplicadas na mesma ordem.

## Determinação do Impacto à Diversidade Microbiana (IDM)

O IDM (Índice de Impacto à Diversidade Microbiana) é um valor numérico que consiste da distância métrica de *Pearson*, gerada na análise estatística de agrupamento, entre o padrão de bandas obtido a partir da análise PCR/DGGE da amostra de solo avaliada e o padrão da amostra de solo referência. Para que os valores de IDM situem-se entre 0 e 1, calcula-se a razão entre o valor de distância de cada tratamento à referência e o maior valor de distância obtido, que passa a representar um IDM igual a 1. O IDM é, portanto, uma mensuração relativa da diferenciação sofrida pela diversidade microbiana devido a alterações nos fatores bióticos e abióticos do ambiente, sejam motivados por perturbações ou processos naturais

ou antrópicos. A seleção da referência dependerá do conceito de qualidade do solo e dos objetivos do estudo. Como consideramos que a qualidade do solo incorpora não apenas sua capacidade de propiciar níveis de produtividade adequados, mas também de provisão de serviços ecossistêmicos, nossas referências foram uma área com vegetação nativa (mata com mais de 70 anos; IDM 70) e outra em avançado estágio de regeneração (mata de 30 anos; IDM 30). Quanto maior o impacto à diversidade bacteriana, ou seja, quanto mais distante da referência for o padrão de bandas gerado pelo tratamento, mais próximo de 1 será o valor do IDM. Quanto mais similar ao padrão da referência, menor o impacto, e mais próximo de



**Fig. 1.** Perfis da diversidade genotípica, para o gen *rpoB*. Géis de DGGE das amostras de DNA extraídas dos solos sob diferentes tratamentos, amplificadas com os iniciadores para *rpoB*, réplicas terço superior, médio e inferior. Linhas 1 ao 12, as amostras são café, pasto, banana, cultivo 1 ano, cultivo 2 anos, cultivo 3 anos, pousio 1 ano, pousio 3 anos, pousio 5 anos, mata 15 anos, mata 30 anos, mata > 70 anos, respectivamente. As letras M são os marcadores dos géis.

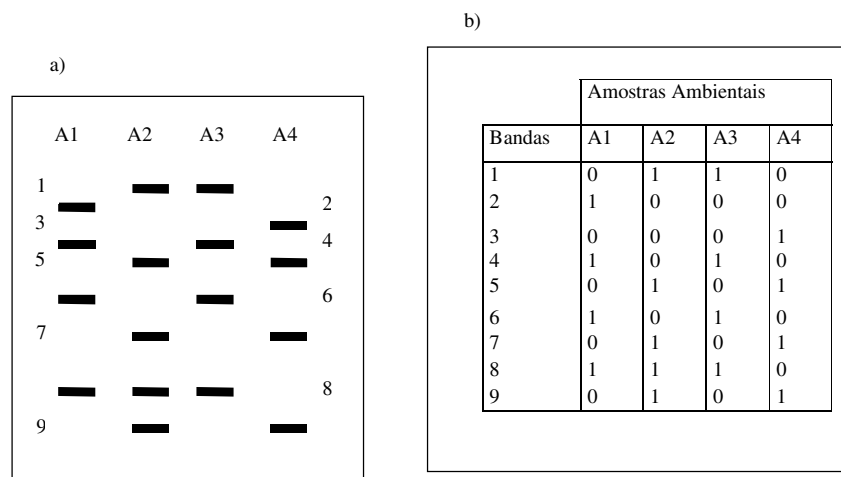


Fig. 2. Representação esquemática para a interpretação dos géis de DGGE. (a) Esquema ilustrativo de um gel de DGGE para amostras ambientais (A1, A2, A3, A4). (b) matriz binária construída a partir do gel de DGGE.

O será o IDM (Coutinho et al., 2002; Aboim, 2004).

## Atributos Analisados

Foram analisados um total de 25 atributos relacionados à qualidade do solo. São eles:

- Atributos químicos: pH, teores de íons de Al, Ca, Mg, P, K, Na, carbono orgânico total, acidez total (H<sub>Al</sub>), soma de bases (S), capacidade de troca catiônica efetiva (t), capacidade de troca catiônica total (T), e saturação por bases (V%) (Embrapa, 1997);
- Atributos físicos: teores de areia grossa (Areia<sub>G</sub>), areia fina (Areia<sub>F</sub>), areia total (Areia<sub>T</sub>), silte, argila, diâmetro médio ponderado (DMP), diâmetro médio geométrico (DMG), índice de estabilidade de agregado (IEA) (Embrapa, 1997; Madari et al., 2004);
- Atributos biológicos: IDM30, IDM70, e contagem de esporos fungos micorrízicos (Micorriza) (Gerdemann & Nicolson, 1963; Coutinho et al., 2002; Aboim, 2004).

## Análises de Correlação

Com auxílio do programa STATISTICA 5.0, foi gerada uma matriz das correlações de Pearson entre as 25 variáveis para 7 tratamentos (C1, C3, P3, P5, M15, M30 e



M > 70). Os demais tratamentos não dispunham de dados para todas as 25 variáveis, e por este motivo não foram incluídos nas análises de correlação. Realizamos uma análise de variância para verificar se os dados de cada terço apresentavam diferenças significativas entre si. Encontramos que estas ocorreram devido ao acaso, com probabilidade superior a 95%, viabilizando o uso dos valores médios de cada tratamento nas análises estatísticas multivariadas (dados não mostrados; Aboim, 2004). As correlações foram realizadas para significância de 95% ( $P < 0,05$ ) e as correlações foram feitas entre os valores médios das variáveis de cada tratamento ( $n = 7$ ).

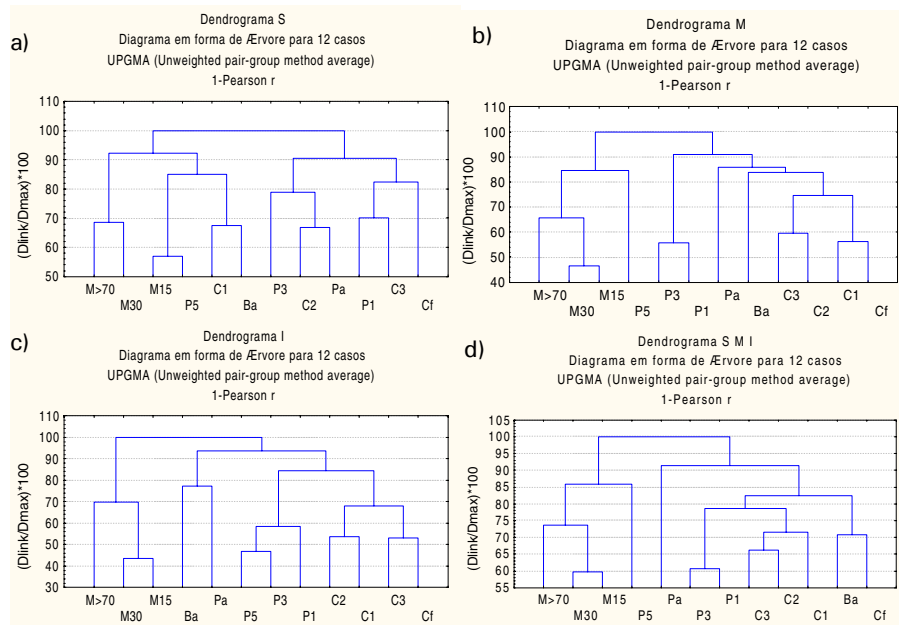
## Resultados e Discussão

As análises de DGGE revelaram alta diversidade de bactérias nos solos estudados, com grande número de bandas presentes nos padrões obtidos (Figura 01). São evidentes bandas com ocorrência em todos os solos, representando genótipos pouco afetados pelas condições ambientais, enquanto para outras há variações entre os tratamentos, sinalizando pressões de seleção distintas a favor ou contra determinados genótipos.

Matrizes binárias, baseadas na presença e ausência de bandas, foram geradas para cada gel, conforme demonstrado na Figura 2. Da mesma forma, outra matriz foi gerada para a composição dos 3 géis. A partir destas matrizes, foram realizadas análises de agrupamento entre os tratamentos, utilizando o coeficiente de *Pearson* como distância métrica e o UPGMA como método de aglomeração, gerando uma matriz de distância e um dendrograma para cada gel, assim como para o gel composto, num total de 4 dendrogramas (Figura 3 e Tabela 1-a).

O dendrograma composto (Figura 3-d) apresentou os resultados mais robustos, conforme descrito a seguir, e os agrupamentos revelados não diferiram significativamente dos observados em cada dendrograma isolado (Figuras 3-a, b e c), validando a estratégia adotada.

O dendrograma do terço superior (Figura 3-a) apresentou a formação de dois grandes agrupamentos: 1) as matas (M > 70, M30 e M15), o pousio de 5 anos, o cultivo de 1 ano, e o bananal; e 2) os demais cultivos (C2, C3, Cf), o pasto, e os pousios de 1 e 3 anos. Um ponto interessante a ressaltar nesta figura, apesar de existir uma diferença entre a M > 70 e M30 anos, elas formaram um sub grupo, e a M15 esteve mais próxima do pousio 5 anos.



**Fig. 3.** Análise de agrupamento das estruturas de comunidade de bactérias do solo dos diferentes tratamentos com as réplicas: a) terço superior; b) terço médio, c) terço inferior. Na letra (d) análise simultânea para os três géis de DGGE.

O dendrograma do terço médio (Figura 3-b) também formou dois grandes grupos: 1) as matas e o pousio de 5 anos; e 2) o restante dos tratamentos (P1, P3, C1, C2, C3, Ba, Pa, Cf). Para este resultado a mata 30 anos já estava mais próxima da 15 anos, ficando a mata com mais de 70 anos distante delas, o pousio de 5 anos encontrou-se fora deste subgrupo formado pelas matas e ficou bem destacado delas, embora fosse parte integrante do agrupamento maior.

Já o terceiro dendrograma (terço inferior) difere-se dos outros dois pois apresentou 3 grandes grupos: 1) as matas, com aspecto similar ao dendrograma do terço médio; 2) a banana e o pasto, com uma distância entre eles acentuada; e 3) contendo dois subgrupos, discriminando os pousios (P5, P3, P1), dos cultivos (C2, C1, C3, Cf) (Figura 3-c).

Os três dendrogramas possuíram em comum a separação sempre presente das matas em um grupo a parte. Porém, seria equivocado, dos pontos de vista ecológico e agrônomo, discutir os resultados dos dendrogramas separadamente, já que eles são réplicas dos mesmos tratamentos.

**Tabela 1.** Matriz de distância de *Pearson* gerada pelo programa STATISTICA 5.0, usando método de aglomeração UPGMA, para análise integrada das réplicas (S,M,I) de PCR-DGGE Tratamentos: Café (Cf), pasto (Pa), banana (Ba), cultivo 1 ano (C1), cultivo 2 anos (C2), cultivo 3 anos (C3), pousio 1 ano (P1), pousio 3 anos (P3), pousio 5 anos (P5), mata 15 anos (M15), mata 30 anos (M30) e mata com mais de 70 anos (M>70). Valores de distância para os tratamentos referência M30 e M>70.

	Cf	Pa	Ba	C1	C2	C3	P1	P3	P5	M15	M30	M>70
Cf	0.00	0.75	0.65	0.67	0.82	0.72	0.75	0.69	0.88	1.02	1.02	0.94
Pa	0.75	0.00	0.78	0.92	0.74	0.91	0.98	0.82	0.96	0.94	0.94	0.90
Ba	0.65	0.78	0.00	0.72	0.81	0.80	0.85	0.80	0.86	0.98	1.02	0.99
C1	0.67	0.92	0.72	0.00	0.61	0.71	0.83	0.78	0.91	0.94	1.00	0.89
C2	0.82	0.74	0.81	0.61	0.00	0.61	0.64	0.73	0.99	0.91	1.00	0.92
C3	0.72	0.91	0.80	0.71	0.61	0.00	0.61	0.78	0.91	0.91	0.88	0.82
P1	0.75	0.98	0.85	0.83	0.64	0.61	0.00	0.56	0.83	0.93	0.95	0.79
P3	0.69	0.82	0.80	0.78	0.73	0.78	0.56	0.00	0.81	0.90	0.93	0.91
P5	0.88	0.96	0.86	0.91	0.99	0.91	0.83	0.81	0.00	0.70	0.78	0.89
M15	1.02	0.94	0.98	0.94	0.91	0.91	0.93	0.90	0.70	0.00	0.55	0.81
<b>M30</b>	<b>1.02</b>	<b>0.94</b>	<b>1.02</b>	<b>1.00</b>	<b>1.00</b>	<b>0.88</b>	<b>0.95</b>	<b>0.93</b>	<b>0.78</b>	<b>0.55</b>	<b>0.00</b>	<b>0.55</b>
<b>M&gt;70</b>	<b>0.94</b>	<b>0.90</b>	<b>0.99</b>	<b>0.89</b>	<b>0.92</b>	<b>0.82</b>	<b>0.79</b>	<b>0.91</b>	<b>0.89</b>	<b>0.81</b>	<b>0.55</b>	<b>0.00</b>

O resultado do dendrograma gerado da interação dos três géis (Figura 3-d) foi bastante satisfatório, mostrando em um único gráfico a dinâmica da diversidade bacteriana de acordo com tratamentos estudados. Verificou-se para esse ambiente que os perfis da diversidade bacteriana genotípica agruparam-se primeiramente de acordo com o tipo de ecossistema: natural e agrícola, verificado com a formação dos dois grupos maiores: 1) matas e o pousio de 5 anos; e 2) os diferentes cultivos e os pousios de 1 e 3 anos. O tipo de sistema de produção influenciou as estruturas das comunidades bacterianas do solo, uma vez que observamos a formação de dois subgrupos: 2a) banana e café; 2b) cultivos anuais.

Os resultados obtidos com as análises de agrupamento são qualitativos, mostrando níveis de similaridade entre tratamentos. Estes resultados são importantes para a verificação de como o manejo agrícola pode estar interferindo na estrutura das comunidades bacterianas totais do solo. Porém, existe a necessidade de mensurar esta interferência ao ecossistema, de forma a obter dados quantitativos sobre os possíveis impactos dos diferentes usos do solo sobre a comunidade microbiana, que por sua vez possam ser correlacionados com funções ecológicas do solo.

A matriz de distância (Tabela 1) permite análises quantitativas da dissimilaridade entre quaisquer pares de tratamentos. Por exemplo, o dendograma SMI (Figura 3-d) dá uma idéia do quanto os tratamentos café e pasto são diferentes. Já a matriz de distância de *Pearson* possibilita quantificar esta dissimilaridade, que no caso é representada pelo valor 0,75, maior que a diferença entre café e banana (0,69) e menor que sua distância para as matas de 15 e 30 anos (1,02). Os valores encontrados na matriz de distância permitem, então, análises comparativas quantificadas entre os tratamentos, representando então, informação suplementar a extraída dos dendogramas.

A conversão dos resultados qualitativos produzidos pela técnica de PCR/DGGE, em valores quantitativos, representado pelo IDM (Tabela 2), permitiu sua incorporação em análises estatísticas multivariadas, representando o parâmetro de diversidade microbiana em estudos integrados de qualidade do solo.

**Tabela 2.** Valores de IDM calculados usando as matas com mais de 70 anos e 30 anos como amostras referência, a partir dos valores de distância das duas últimas linhas da tabela 1, transformados para distribuição em uma escala de 0 a 1 ( $IDM = Vd_i/Vd_{m\acute{a}x}$ ; onde  $Vd_i$  = valor de distância entre o tratamento  $i$  e o tratamento referência, e  $Vd_{m\acute{a}x}$  = maior valor de distância entre tratamentos e referência).

	IDM70	IDM30
Cf	0,95	1,00
Pa	0,91	0,91
Ba	1,00	1,00
C1	0,90	0,98
C2	0,93	0,98
C3	0,83	0,86
P1	0,80	0,93
P3	0,92	0,91
P5	0,90	0,77
M15	0,82	0,54
M30	0,56	0,00
M>70	0,00	-

O dendograma integrado (Figura 3d) revelou uma abrupta transformação da estrutura de comunidades bacterianas do solo quando este é submetido às práticas de cultivo (corte, queima, uso de herbicidas, calagem, aração, adubação, plantio, e tratamento fitossanitário). O gene utilizado como marcador molecular da diversidade bacteriana (*rpoB*) foi sensível o suficiente para indicar alterações da estrutura de

comunidades com apenas 1 ano de pousio, e robusto o suficiente para revelar diferenciações consistentes entre os grupos de tratamentos de cultivos temporários, permanentes, e pousios curtos. Os resultados mostraram também que são necessários entre três e cinco anos de pousio para que as comunidades bacterianas do solo voltem a ter estrutura com maior similaridade as das matas mais maduras, acima de 15 anos de idade. Este aparente processo de “sucessão microbiana” no solo está correlacionado com o da sucessão vegetal propriamente dita, entre os pousios de diferentes idades testados (Aboim et al., 2003).

Os resultados das análises dos parâmetros químicos e físicos do solo podem ser vistos na Tabela 3.

A matriz de correlação de Pearson entre as variáveis demonstrou que o IDM apresentou correlações relevantes, dos pontos de vista ecológico e agrônômico, com várias outras variáveis químicas, biológicas, e físicas do solo (Tabela 4). Destacamos aqui as correlações significativas positivas entre o IDM 30 e teores de potássio e pH; e as correlações significativas negativas entre o IDM 30 e o IDM 70 com teores de Al e H + Al. O IDM 70 apresentou correlação negativa significativa com teores de Mg e carbono orgânico, e ainda com a capacidade de troca catiônica total (valor T). Estes resultados evidenciam a forte relação entre a carga orgânica do solo, assim como de sua fertilidade, e a estrutura das comunidades bacterianas presentes no solo. O comportamento das variáveis entre os tratamentos e as implicações disto para o manejo agrícola não são temas deste trabalho e constarão de outro artigo, em preparação.

Uma comparação entre o uso das matas de 30 e com mais de 70 anos como referência para o cálculo do IDM revela que ambas poderiam ser utilizadas, sendo que dependendo da hipótese testada uma teria preferência sobre a outra. Se o objetivo do estudo fosse avaliar o processo de sucessão ecológica em fragmentos florestais de Mata Atlântica de diferentes idades, a melhor referência seria a Mata mais antiga, cujas variáveis apresentam valores muito distintos das demais. O IDM70 não apresentou poder discriminatório entre os tratamento de cultivo e pousio curtos. Por sua vez, o IDM30 foi um bom indicador da recuperação da diversidade microbiana a partir do pousio de 5 anos (Figura 4). Portanto, caso o objeto de estudo seja avaliar o impacto de diferentes manejos agrícolas sobre a qualidade do solo, e monitorar sua recuperação enquanto solo agrícola, concluímos que seja utilizada uma mata secundária em avançado estágio de regeneração, como a referência para o estudo.

**Tabela 3.** Atributos químicos e físicos para do solo dos tratamentos cultivo 1 ano (C1), cultivo 3 anos (C3), pousio 3 anos (P3), pousio 5 anos (P5), mata 15 anos (M15), mata 30 anos (M30) e mata com mais de 70 anos (M > 70). Valores representam uma média das três repetições amostrais. S: soma de bases; t: capacidade de troca catiônica efetiva; T: capacidade de troca catiônica total; V%: saturação de bases; DMP: diâmetro médio ponderado; DMG: diâmetro médio geométrico; IEA: índice de estabilidade de agregado (IEA).

Tratamento	PH	Al	Ca	Mg	Na	K	H+Al	P	C <sub>org</sub>	Valor da Soma			V%	Areia grossa	Areia fina	Areia total	Silte	Argila	DMP	DMG	IEA
										S	t	T									
				cmol <sub>c</sub> .Kg <sup>-1</sup>				ppm	mg.g <sup>-1</sup>	mg.g <sup>-1</sup>	mg.g <sup>-1</sup>	mg.g <sup>-1</sup>	g.Kg <sup>-1</sup>	g.Kg <sup>-1</sup>	g.Kg <sup>-1</sup>	g.Kg <sup>-1</sup>	g.Kg <sup>-1</sup>	mm	%		
C1	5,6	0,0	6,6	1,3	0,50	0,340	4,0	90,0	1,5	8,8	8,8	12,8	69	442	102	544	248	202	1,8	1,1	59,3
C3	5,3	0,0	5,6	0,9	0,23	0,272	4,5	57,7	1,6	7,3	7,3	11,7	62	427	111	538	175	220	2,3	1,1	65,6
P3	5,1	0,0	5,2	0,9	0,20	0,340	4,3	53,3	1,4	7,0	7,0	11,3	62	485	103	588	207	205	3,5	1,2	83,3
P5	5,3	0,0	5,8	1,6	0,17	0,348	4,0	8,3	1,5	8,3	8,3	12,3	67	412	87	499	253	258	8,8	1,3	93,3
M15	5,0	0,3	2,6	1,5	0,30	0,174	6,9	2,7	1,9	4,6	4,9	11,4	38	387	83	470	250	280	9,6	1,4	97,2
M30	4,8	0,4	3,8	1,3	0,40	0,163	7,1	3,7	1,7	5,6	6,0	12,7	42	524	96	620	165	213	9,1	1,4	93,0
M > 70	4,7	0,9	4,7	3,2	0,43	0,266	10,0	8,0	2,4	8,6	9,6	18,6	44	481	118	599	192	209	9,3	1,3	48,6

**Tabela 4.** Matriz de correlação de Pearson, as correlações são marcadas em significância de  $p < 0,05$ ;  $N = 7$  (valores médios de C1, C3, P3, P5, M15, M30 e M>70).

	pH	Al	Ca	Mg	Ca	Mg	P	K	Na	H <sub>2</sub> O	%Corg	S	t	T	V%	Areia_G	Areia_F	Areia_T	Argila	DMP	DMG	IEA	IDM70	IDM30	Mirza	
PH	1.00																									
Al	<b>-0.81*</b>	1.00																								
Ca_Mg	0.39	0.04	1.00																							
Ca	0.73	<b>-0.47</b>	<b>0.85*</b>	1.00																						
Mg	<b>-0.54</b>	<b>0.89*</b>	0.40	<b>-0.15</b>	1.00																					
P	<b>0.80*</b>	<b>-0.57</b>	0.43	0.74	<b>-0.47</b>	1.00																				
K	0.66	<b>-0.48</b>	0.75	<b>0.87*</b>	<b>-0.11</b>	0.59	1.00																			
Na	<b>-0.09</b>	0.48	0.24	0.01	0.43	0.18	<b>-0.25</b>	1.00																		
H <sub>2</sub> O	<b>-0.86*</b>	<b>0.99*</b>	<b>-0.10</b>	<b>-0.59</b>	<b>0.82*</b>	<b>-0.63</b>	<b>-0.60</b>	0.46	1.00																	
%Corg	<b>-0.72</b>	<b>0.97*</b>	0.02	<b>-0.49</b>	<b>0.88*</b>	<b>-0.57</b>	<b>-0.49</b>	0.42	<b>0.95*</b>	1.00																
S	0.43	<b>-0.02</b>	<b>1.00*</b>	<b>0.87*</b>	0.35	0.46	<b>0.80*</b>	0.19	<b>-0.16</b>	<b>-0.04</b>	1.00															
t	0.25	0.19	<b>0.99*</b>	<b>0.75*</b>	0.53	0.33	0.68	0.29	0.05	0.17	<b>0.98*</b>	1.00														
T	<b>-0.49</b>	<b>0.86*</b>	0.54	0.03	<b>0.95*</b>	<b>-0.27</b>	<b>-0.03</b>	0.53	<b>0.78*</b>	<b>0.82*</b>	0.49	0.66	1.00													
V%	<b>0.86*</b>	<b>-0.75</b>	0.62	<b>0.92*</b>	<b>-0.42</b>	0.72	<b>0.90*</b>	<b>-0.28</b>	<b>0.84*</b>	<b>-0.73</b>	0.67	0.50	<b>-0.32</b>	1.00												
Areia_G	<b>-0.48</b>	0.33	0.09	0.02	0.13	<b>-0.04</b>	<b>-0.14</b>	0.35	0.34	0.10	0.06	0.13	0.34	<b>-0.21</b>	1.00											
Areia_F	<b>-0.12</b>	0.39	0.57	0.40	0.36	0.36	0.22	0.31	0.31	0.34	0.54	0.61	0.62	0.10	0.47	1.00										
Areia_T	<b>-0.48</b>	0.43	0.22	0.09	0.25	0.03	<b>-0.09</b>	0.40	0.42	0.22	0.19	0.28	0.49	<b>-0.19</b>	<b>0.97*</b>	0.67	1.00									
Slite	0.50	<b>-0.33</b>	0.09	0.11	<b>-0.02</b>	0.10	0.39	<b>-0.10</b>	<b>-0.36</b>	<b>-0.22</b>	0.13	0.06	<b>-0.24</b>	0.31	<b>-0.72</b>	<b>-0.62</b>	<b>-0.83*</b>	0.56	1.00							
Argila	<b>-0.07</b>	<b>-0.06</b>	<b>-0.52</b>	<b>-0.02</b>	<b>-0.57</b>	<b>-0.31</b>	<b>-0.44</b>	<b>-0.01</b>	0.10	<b>-0.51</b>	<b>-0.51</b>	<b>-0.33</b>	<b>-0.29</b>	<b>-0.75*</b>	<b>-0.78*</b>	<b>-0.83*</b>	<b>-0.83*</b>	0.56	1.00							
DMP	<b>-0.76*</b>	0.63	<b>-0.35</b>	<b>-0.71</b>	0.57	<b>-0.97*</b>	<b>-0.57</b>	0.00	0.67	0.62	<b>-0.39</b>	<b>-0.24</b>	0.36	<b>-0.73</b>	0.03	<b>-0.39</b>	<b>-0.04</b>	0.04	0.55	1.00						
DMG	<b>-0.75</b>	0.46	<b>-0.55</b>	<b>-0.79</b>	0.34	<b>-0.96*</b>	<b>-0.56</b>	<b>-0.22</b>	0.53	0.43	<b>-0.57</b>	<b>-0.46</b>	0.11	<b>-0.71</b>	0.03	<b>-0.52</b>	<b>-0.09</b>	0.06	0.61	<b>0.94*</b>	1.00					
IEA	<b>-0.14</b>	<b>-0.37</b>	<b>-0.75</b>	<b>-0.52</b>	<b>-0.49</b>	<b>-0.48</b>	<b>-0.34</b>	<b>-0.53</b>	<b>-0.26</b>	<b>-0.38</b>	<b>-0.72</b>	<b>-0.78*</b>	<b>-0.68</b>	<b>-0.21</b>	<b>-0.18</b>	<b>-0.88*</b>	<b>-0.39</b>	0.23	0.65	0.42	0.63	1.00				
IDM70	0.74	<b>-0.96*</b>	<b>-0.24</b>	0.26	<b>-0.89*</b>	0.46	0.34	<b>-0.49</b>	<b>-0.93*</b>	<b>-0.90*</b>	<b>-0.18</b>	<b>-0.38</b>	<b>-0.83*</b>	0.59	<b>-0.46</b>	<b>-0.57</b>	<b>-0.88</b>	<b>-0.39</b>	0.23	0.65	0.42	0.63	1.00			
IDM30	<b>0.85*</b>	<b>-0.89*</b>	0.65	0.69	<b>-0.33</b>	0.73	<b>0.84*</b>	<b>-0.23</b>	<b>-0.88*</b>	<b>-0.62</b>	0.68	0.65	<b>-0.27</b>	0.80	<b>-0.48</b>	0.36	<b>-0.37</b>	0.46	<b>-0.16</b>	<b>-0.73</b>	<b>-0.69</b>	<b>-0.62</b>	<b>0.95*</b>	1.00		
Mirza	<b>-0.75</b>	0.53	<b>-0.78*</b>	<b>-0.97*</b>	0.22	<b>-0.67</b>	<b>-0.84*</b>	0.17	0.64	0.51	<b>-0.80*</b>	<b>-0.68</b>	0.06	<b>-0.93*</b>	0.12	<b>-0.37</b>	0.03	<b>-0.08</b>	0.41	0.70	<b>0.77*</b>	0.45	<b>-0.32</b>	<b>-0.70</b>	1.00	

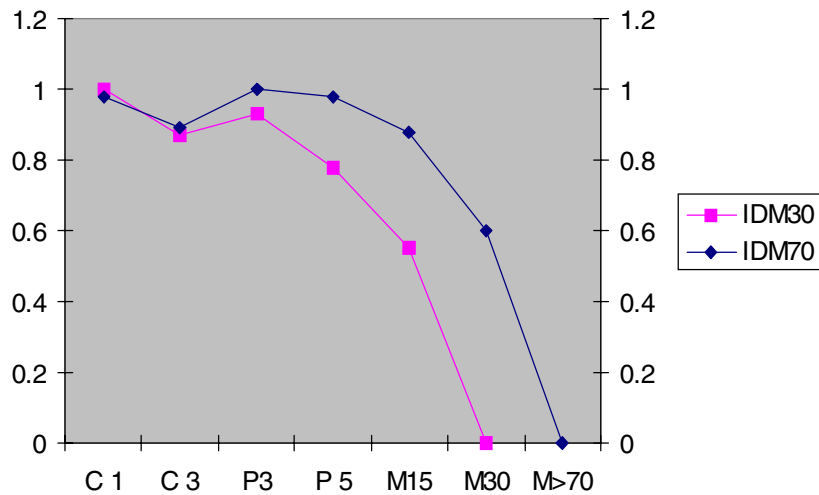


Fig. 4. Variação dos valores de IDM30 e IDM 70 (impacto à diversidade bacteriana referentes às matas de 30 e mais de 70 anos) com os tratamentos cultivo 1 e 3 anos (C1 e C3), pousios 3 e 5 anos (P3 e P5) e matas 15, 30 e 70 anos (M15, M30, M>70).

## Conclusões

As análises dos resultados demonstraram que a diversidade microbiana pode ser utilizada como um indicador biológico de qualidade do solo sensível às variações ambientais e aos efeitos do manejo do solo. A estratégia apresentada para a análise da diversidade microbiana através de amplificação por PCR de genes marcadores moleculares a partir de DNA extraído do solo, e sua avaliação discriminatória pelo método do DGGE, provou ser de grande utilidade em estudos de qualidade do solo sob diferentes usos agrícolas e estágios de sucessão ecológica. Recomendamos sua adoção pelos laboratórios engajados em investigações da biodiversidade do solo, através de análises moleculares.

Alguns dos principais obstáculos ao uso desta técnica de forma rotineira foram removidos:

- 1) Ao analisar simultaneamente os géis derivados de cada repetição experimental, resolvemos o problema de como interpretar resultados de DGGE de amos-



tras provenientes de experimentos de campo. O resultado é mais robusto, uma vez que os coeficientes de correlação de Pearson obtidos desta forma incorporam uma quantidade de informação aproximadamente 3 vezes maior (ou tantas vezes quantas forem o número de replicatas) do que se cada gel fosse analisado individualmente. Esta estratégia “suavizou” as diferenças entre géis devido a problemas de reprodutibilidade, intrínsecas à técnica de DGGE (Iwamoto *et al.* 2000; Smalla *et al.* 2001). Bandas de ocorrência casual, produtos de artefatos do PCR e que não representam de fato a amostra analisada, têm influência reduzida no resultado final, enquanto aquelas que verdadeiramente provêm de genótipos dominantes no ambiente, têm influência amplificada;

2) O cálculo e análise dos valores de IDM proporcionou a comparação da diversidade bacteriana genotípica dos diferentes tratamentos agrícolas com a dos ecossistemas preservados, e ainda, esta comparação gerou valores numéricos que possibilitaram a incorporação da variável “impacto à diversidade microbiana” como mais um parâmetro biológico em estudos de qualidade do solo. A variável IDM mostrou ser sensível às variações ambientais causadas pelo manejo, de fácil interpretação, eficaz na correlação com outros atributos de qualidade do solo. Sua interpretação propicia a compreensão do comportamento do solo frente à intervenção antrópica, e é de utilidade para a elaboração de recomendações visando o aprimoramento e a sustentabilidade do sistema de produção agrícola. O IDM pode ainda, ser utilizado na elucidação de processos ecológicos do solo, já que é viável a utilização de iniciadores de grupos funcionais de microrganismos específicos de interesse ecológico, tais como fixadores de nitrogênio, decompositores de matéria orgânica, produtores de gases causadores do efeito estufa, agentes de controle biológico, e degradadores de poluentes, permitindo a avaliação das estruturas de comunidades microbianas em condições diferenciadas de pressão antrópica.

## Referências Bibliográficas

ABOIM, M. C. R. **Impacto à diversidade bacteriana e sua relação com indicadores de qualidade do solo em ecossistemas agrícolas e naturais de mata atlântica, na região serrana do Rio de Janeiro**. 97 f. 2004. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

ABOIM, M. C. R.; BARBOSA, J. C.; FREITAS, W. K.; MAGALHÃES, L. M.; CORREIA, E.; REIS, L. L.; ROSADO, A. S.; COUTINHO, H. L. C. Biodiversidade vegetal e do solo em ecossistemas agrícolas e naturais de Mata Atlântica na região Serrana do Estado do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 4.; SIMPÓSIO DE BIODIVERSIDADE, UNIDADES DE CONSERVAÇÃO, INDICADORES AMBIENTAIS, CAATINGA E CERRADO, 9 - 14 nov. 2003. **Anais de trabalhos completos...** Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2003. p. 27.

ARSHAD, M. A.; MARTIN, S. Identifying critical limits for soil quality indicators in agro-ecosystems. **Agriculture Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 88, p. 153-160, 2002.

BAKKEN, L. R. Separation and purification of bacteria from soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Amsterdam, v. 49, p. 143-169, 1995.

COUTINHO, H. L. C.; FERNANDES, I. S.; ABOIM, M. C. R.; PEIXOTO, R. S.; ROSADO, A. S.; MACHADO, P. L. O.; MADARI, B.; ANDRADE, A. G.; BENITES, V. M.; SILVA, C. A.; LIMA, J. A. S.; GUIMARÃES, C. Índice de impacto à diversidade microbiana (IDM), um novo indicador biológico para avaliação da qualidade do solo. In: REUNIAO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRICAÇÃO DE PLANTAS, 25.; REUNIAO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 9.; SIMPOSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 8.; REUNIAO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 4., 2002, Rio de Janeiro. Agricultura: bases ecológicas para o desenvolvimento social e econômico sustentado. **Fertbio 2002**. [Rio de Janeiro]: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo: UFRRJ - Departamento de Solos: Embrapa Agrobiologia: Embrapa Solos, 2002. 1 CD ROM.

COUTINHO, H. L. C.; OLIVEIRA, V. M.; MANFIO, G. P., ROSADO, A. S. Evaluating the microbial diversity of soil samples: methodological innovations. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.3, n.71, p.491-503,1999.

DORAN, J. W. Soil health and global sustainability: translating science into practice. **Agriculture Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 88, p. 119-127, 2002.

DORAN, J. W.; ZEISS, M. R. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.14, p. 3-11, 2000.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de metodos de análise de solo**. 2.ed. rev. atual. Rio de Janeiro, 1997. 212 p. (EMBRAPA-CNPS. Documentos, 1).

FILIP, Z. International approach to assessing soil quality by ecologically-related biological parameters. **Agriculture Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 88, p. 169-174, 2002.

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

IWAMOTO, T.; TANI, K.; NAKAMURA, K.; SUZUKI, Y.; KITAGAWA, M.; EGUCHI, M.; NASU, M. Monitoring impact of in situ biostimulation treatment on groundwater bacterial community by DGGE. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 32, p. 129-141, 2000.

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

KOZDRÓJ, J.; ELSAS, J. D. van. Structural diversity of microbial communities in arable soils of a heavily industrialised area determined by PCR-DGGE fingerprinting na FAME profiling. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 17, p. 31-42, 2001.

MADARI B.; MACHADO P. L. O. A.; TORRES E.; ANDRADE A. G.; VALENCIA, L. I. O. No tillage and crop rotation effects on soil aggregation and organic carbon in a Rhodic Ferralsol from Southern Brazil. **Soil & Tillage Research**, Amsterdam, v.80, p. 185-200, 2005.

MARTIN-LAURENT, F.; PHILIPPOT, L.; HALLET, S.; CHAUSSOD, R.; GERMON, J. C.; SOULAS, G.; CATROUX, G. DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n.5, p. 2354-2359, 2001.

PEIXOTO, R. S.; COUTINHO, H. L. C.; RUMJANEK, N. G.; MACRAE, A.; ROSADO, A. S. Use rpoB and 16S rRNA genes to analyse bacterial diversity of a tropical soil using PCR and DGGE. **Letters in Applied Microbiology**, London, v. 35, p. 316-320, 2002.

POWLSON, D. S.; HIRSCH, P. R., BROOKES, P. C. The role of soil microorganisms in soil organic matter conservation in the tropics. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v. 61 p. 41-51,2001.

SMALLA, K.; WIELAND, D.; BUCHNER, A.; ZOCK, A.; PARZY, J.; KAISER, S.; ROSKOT, N.; HEUNER, H.; BERG, G. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n.10, p.4742-4751, 2001.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdam, v. 5, p. 240–245, 2002.

TREVORS, J. T.; ELSAS, J. D. van. **Nucleic acids in the environment: methods and applications**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1995. 1 v.

ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; COUTINHO, H. L. C.; NEVES, M. C. P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v.20,n.3,p.391-411,2003.