



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA

MESTRADO EM AGRONOMIA

BRUNO BRABO DE SOUSA

DENSIDADE E DIVERSIDADE BIOQUÍMICA DE RIZOBACTÉRIAS ASSOCIADAS
A *Bellucia grossularioides* (L). EM ÁREAS NATIVAS E REFLORESTADAS NA BASE
DE URUCU, COARI-AM.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA

MESTRADO EM AGRONOMIA

BRUNO BRABO DE SOUSA

DENSIDADE E DIVERSIDADE BIOQUÍMICA DE RIZOBACTÉRIAS ASSOCIADAS
A *Bellucia grossularioides* (L). EM ÁREAS NATIVAS E REFLORESTADAS NA BASE
DE URUCU, COARI-AM.

TUSE
~~DISSERTAÇÃO~~
634959811
5725

BELÉM
2010



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA
MESTRADO EM AGRONOMIA

BRUNO BRABO DE SOUSA

**DENSIDADE E DIVERSIDADE BIOQUÍMICA DE RIZOBACTÉRIAS
ASSOCIADAS A *Bellucia grossularioides* (L). EM ÁREAS NATIVAS E
REFLORESTADAS NA BASE DE URUCU, COARI-AM.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do curso de mestrado em Agronomia, área de concentração Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre em agronomia.

Orientadora: Prof. Dr .Gisele Barata da Silva

BELÉM
2010

BRUNO BRABO DE SOUSA

Sousa, Bruno Brabo

Densidade e diversidade bioquímica de rizobactérias associadas a *Bellucia grossularioides* (L) em áreas nativas e reflorestamento na base de urucu, Coari-AM./ Bruno Brabo de Sousa. – Belém, 2010.

61f.: il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2010.

1. Silvicultura - Amazônia 2. Diversidade Bioquímica 3. Rizobactérias 4. Atributos Microbiológicos 5. Reflorestamento.
Título.

CDD 634.959811



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA**

BRUNO BRABO DE SOUSA

**DENSIDADE E DIVERSIDADE BIOQUÍMICA DE RIZOBACTÉRIAS ASSOCIADAS
A *Bellucia grossularioides* (L). EM ÁREAS NATIVAS E REFLORESTADAS NA BASE
DE URUCU, COARI-AM.**

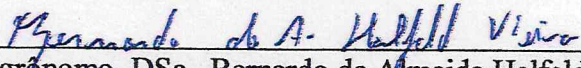
Dissertação apresentada à Universidade
Federal Rural da Amazônia, como parte
das exigências do curso de mestrado em
Agronomia, área de concentração
Produção Vegetal, para obtenção do
título de Mestre em agronomia.

Aprovado em 8 de fevereiro de 2010

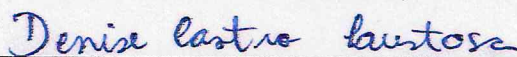
COMISSÃO EXAMINADORA



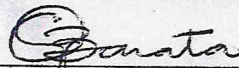
Eng. Agrônoma, DSc., Prof^a. Vânia Silva de Melo
Universidade Federal Rural da Amazônia



Eng. Agrônomo, DSc., Bernardo de Almeida Halfeld Vieira
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Roraima.



Eng. Agrônoma, DSc., prof^a. Denise Castro Lustosa
Universidade Federal do Oeste do Pará



Eng. Agrônoma, DSc., Prof^a. Gisele Barata da Silva
Orientador
Universidade Federal Rural da Amazônia

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS por me proporcionar saúde e disposição dia após dia.

Agradeço a minha orientadora Prof^a. Dr. Gisele Barata da Silva, pela orientação, paciência, ajuda, compreensão e críticas que contribuíram positivamente para minha formação como pesquisador e pessoa.

A Prof^a. Dr^a. Denise de Castro Lustosa, que forneceu apoio substancial para realização e desenvolvidos do trabalho, durante esse período.

Ao Prof. Dr. Ulisses Brigatto Albino, que se dispôs a nos ajudar repassando seus conhecimentos bastante úteis e relevantes para realização deste trabalho.

A Prof^a. Dr. Vânia Silva de Melo, que contribuiu com informações cruciais para a finalização do trabalho.

A minha família pelo apoio, educação e carinho e por tudo que representam na minha vida.

As minhas amigas, Alessandra Moraes e Joseani Castro que me acompanharam, apoiaram e contribuíram até o fim dessa jornada.

A todos os amigos do laboratório (Cyntia, Claudeana, Michelle, Lauryne, Hellen, Darlyne, Moara, Laudecir, Jackeline, Josias, Arinaldo e Marcela), pela amizade e pela grande contribuição nesse trabalho.

A todos os amigos de mestrado, pois dividimos horas difíceis e excelentes momentos de alegria.

A todos meus amigos, que direta ou indiretamente me ajudaram na realização deste trabalho.

E finalmente, Agradeço a Universidade Federal Rural da Amazônia, instituição que sempre terá meu enorme respeito.

RESUMO	
ABSTRACT	
1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 REFLORESTAMENTO	14
2.2 RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE PLANTAS (RPCPs)	16
2.3 GRUPOS FUNCIONAIS	17
2.4 ATRIBUTOS MICROBIOLÓGICOS DO SOLO	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 DENSIDADE DE RIZOBACTÉRIAS ASSOCIADAS A <i>BELLUCIA GROSSULARIOIDES</i>	29
4.2 ATRIBUTOS MICROBIOLÓGICOS RB, CBM, QCO_2	31
4.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA	33
4.3.1 Bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN)	33
4.3.2 Atividade enzimática do ciclo do carbono	34
4.3.3 Solubilizadoras de fosfato e fosfatase ácida	49
4.3.4 Diversidade bioquímica associada à promoção do crescimento	42
4.4 Caracterização fenotípica	45
5 CONCLUSÕES	49
BIBLIOGRAFIA	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Densidade de rizobactérias associadas a <i>Bellucia grossularioides</i> , proveniente de 14 áreas da floresta Amazônica durante o período chuvoso e seco, na Base de Urucu-Coari-AM, 2008. Valores UFC (Unidade formadora de colônias) transformados para $\log (x+1)$ de UFC g ⁻¹ solo	29
Figura 2	Densidade de rizobactérias associadas a <i>Bellucia grossularioides</i> , proveniente de 14 áreas da floresta Amazônica durante o período chuvoso e seco, na Base de Urucu-Coari-AM, 2008. Valores UFC (Unidade Formadora de colônias) transformados para $\log (x+1)$ de UFC g ⁻¹ .solo	30
Figura 3	Rizobactérias fixadoras de nitrogênio (%) associadas a <i>Bellucia grossularioides</i> , proveniente de 14 áreas da floresta Amazônica durante os períodos chuvoso e seco, na Base Petrolífera de Urucu, Coari/AM, 2008	33
Figura 4	Bactérias fixadoras de nitrogênio in vitro por rizobactérias isoladas da rizosfera de <i>B. grossularioides</i> , 2008	34
Figura 5	Rizobactérias (%) Celulolíticas (A), proteolíticas (B) e Amilolíticas (C) associadas a <i>Bellucia grossularioides</i> , proveniente de 14 áreas da floresta Amazônica durante os períodos chuvoso e seco, na Base Petrolífera de Urucu, Coari/AM, 2008	37
Figura 6	Rizobacterias produtoras de celulase (A), Protease (B) e Amilase (C) in vitro isoladas da rizosfera de <i>B. grossularioides</i> , 2008	39
Figura 7	Rizobactérias solubilizadoras de fosfato (%) associadas a <i>Bellucia grossularioides</i> , proveniente de 14 áreas da floresta Amazônica durante os períodos chuvoso e seco, na Base Petrolífera de Urucu, Coari/AM, 2008	40
Figura 8	Solubilização de fosfato in vitro por rizobactérias isoladas da rizosfera de <i>B. grossularioides</i> , 2008	41
Figura 9	Rizobactérias (%) produtoras de ácido-indol-acético AIA (A), Sideróforos (B), Citocininas (C) Giberelinas (D) e associadas à <i>Bellucia grossularioides</i> , proveniente de 14 áreas da floresta Amazônica durante os períodos chuvoso e seco, na Base Petrolífera de Urucu, Coari/AM, 2008	42
Figura 10	Produção de AIA (A), Produção de sideróforos (B), Produção de citocininas e giberelinas (C). in vitro por rizobactérias isoladas da rizosfera de <i>B. grossularioides</i> , 2008	44
Figura 11	Dendograma da diversidade fenotípica de rizobactérias associadas à espécie goiaba de anta (<i>Bellucia grossularioides</i>), das diferentes áreas da Base petrolífera de Urucu, Coari/AM, durante os períodos chuvoso e seco. Formados a partir de 43 grupos fenotípicos	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados de Precipitação do período seco e chuvoso, Temperatura média, 20 Umidade relativa (%), em áreas de mata nativa, clareira e jazidas reflorestadas, nos períodos chuvoso e seco, da Base Petrolífera de Urucu, Coari-AM, 2008.

Tabela 2 – Dados de fertilidade do solo das áreas de mata nativa, clareira e jazidas 21 reflorestadas, da Base Petrolífera de Urucu, Coari-AM, 2008.

Tabela 3 – Respiração basal (RB), carbono da biomassa microbiana (CBM) e quociente 32 metabólico (QM) de solos rizosféricos da espécie *Bellucia grossulariodes*, na camada 0-10cm, em área de mata nativa, clareira e jazidas, nos períodos chuvoso e seco, da Base Petrolífera de Urucu, Coari-AM, 2008.

Tabela 4. Atividade da enzima fosfatase ácida em $\mu\text{g/ g}^{-1}$ de solo na rizosfera de espécie 39 *Bellucia grossulariodes* na camada 0-10cm, em área de mata nativa, clareira e jazidas, nos períodos seco e chuvoso, na Base petrolífera de Urucu, Coari/AM, em 2008.

Tabela 5. Índice de diversidade de Shannon, a partir dos 43 grupos de rizobactérias 46 encontrados em associação com *Bellucia grossulariodes* nas áreas de mata e reflorestadas da, Base petrolífera de Urucu, Coari,AM, 2008.

Tabela 6. Caracterização fenotípica de rizobactérias associadas a espécie *Bellucia* 47 *grossulariodes* em diferentes áreas mata ,jazida e clareira,da Base petrolífera de Urucu, Coari/AM, durante os períodos chuvoso e seco, 2008.

RESUMO: Para minimizar os impactos causados pelo processo de degradação provocado pela exploração petrolífera, utilizam-se espécies nativas rústicas, tolerantes aos períodos secos e à baixa fertilidade do solo, e capazes de produzir grande quantidade de matéria orgânica em reflorestamentos. A espécie Goiaba de anta (*Bellucia grossularioides*). Possui grande importância dentro do processo de recuperação. Objetivando estudar a diversidade bioquímica de rizobactérias associadas a *Bellucia grossularioides*, em áreas nativas e reflorestadas, na base de Urucu, Coari, AM, realizou-se o presente trabalho. Foram coletados solos rizosféricos nas camadas 0-20 cm de profundidade nos períodos chuvoso e seco, em 14 áreas (7 áreas de mata, 4 áreas de jazidas reflorestadas e 3 áreas de clareiras reflorestadas). A partir desses solos foram obtidos 118 isolados bacterianos, os quais foram submetidos às seguintes avaliações: UFC (unidade formadora de colônia), caracterização fenotípica, caracterização bioquímica associada à promoção do crescimento: produção de ácido indol acético (AIA), sideróforos, citocininas e giberelinas e, à atividade enzimática: fixação de nitrogênio (BFN); atividades celulolíticas; proteolíticas e amilolíticas, solubilização de fosfato (SF) e fosfatase ácida (FAC). Também foram estudados os parâmetros microbiológicos do solo respiração basal (RB), carbono da biomassa microbiana (CBM) e quociente metabólico qCO_2 , das três áreas em questão. As variáveis de nível populacional UFC, atributos microbiológicos e Índice de Shannon das áreas mostraram que a mata nativa possui maior densidade e diversidade de rizobactérias associadas a *B. grossularioides*, em ambos os períodos do ano. Os microrganismos do ciclo do carbono estão mais presentes nas áreas de recuperação durante o período seco. Já no período chuvoso estão mais presentes na área de mata. A fixação de nitrogênio foi maior, nos dois períodos de coleta, nas áreas de clareira. A avaliação da atividade da fosfatase ácida foi superior na área de mata. Contudo, rizobactérias solubilizadoras de fosfato ocorreram em maior densidade nas áreas de jazida e clareira no período seco e nas áreas de mata e jazida no período chuvoso. Os testes bioquímicos associados à promoção do crescimento mostraram que de um modo geral as áreas de mata e clareira, apresentaram maior porcentagem de rizobactérias com essas características em ambos os períodos de coleta. Com a caracterização fenotípica, foram determinados 43 grupos fenotipicamente iguais entre isolados dentro de cada grupo. Os grupos funcionais de rizobactérias não possuem os isolados pertencentes a uma mesma área, mas sim, distribuídos em todas as áreas estudadas.

Palavras chave: Silvicultura, Diversidade Bioquímica, Rizobactérias, Atributos Microbiológicos, Reflorestamento.

ABSTRACT: To minimize the impacts caused by the process of degradation caused by oil exploration, native species are hardy, tolerant of dry periods and low soil fertility, and capable of producing large quantities of organic matter in reforestation. The species of tapir Guava (*Bellucia grossularioides*). It has great importance in the recovery process. Aiming to study the biochemical diversity of rhizobacteria associated with *Bellucia grossularioides* in native and reforested areas, on the basis of Urucu Coari, AM, was held this job. Rhizosphere soils were collected in layers 0-20 cm deep in the rainy and dry in 14 areas (seven forested areas, four areas of fields and wooded glades reforested areas 3). From these soils were 118 bacterial isolates, which underwent the following assessments: CFU (colony forming unit), phenotypic characterization, biochemical characterization associated with the promotion of growth: production of indole acetic acid (IAA), siderophores, and cytokinins gibberellins and enzymatic activity: the fixation of nitrogen (BFN), cellulolytic activity, proteolytic and amylase, phosphate solubilization (SF) and acid phosphatase (FAC). Also studied were the Microbiological parameters of soil respiration (BR), microbial biomass carbon (MBC) and metabolic quotient qCO_2 , the three areas concerned. The variables of population level UFC, microbiological attributes and the Shannon index showed that areas of native forest has the highest density and diversity of rhizobacteria associated with *B. grossularioides* in both seasons. The microorganisms of the carbon cycle are more present in areas of recovery during the dry season. In the rainy season are more present in the forested area. Nitrogen fixation was higher in the two sampling periods, areas of clearing. The evaluation of acid phosphatase activity was higher in the forested area. However, phosphate solubilizing rhizobacteria occurred in greater density in areas of deposit and clearing during the dry season and in areas of forest and field in the rainy season. Biochemical tests associated with the promotion of growth showed that in general areas of forest and meadow, a higher percentage of rhizobacteria with these characteristics in both collection periods. With the phenotypic characterization, 43 groups were determined phenotypically identical among isolates within each group. The functional groups do not have the rhizobacteria isolates belonging to the same area, but distributed in all areas studied.

Keywords: Forestry, Diversity Biochemistry, Rhizobacteria, Microbiological Attributes, Reforestation.

1 INTRODUÇÃO

As atividades de prospecção e produção de gás e petróleo na bacia de Urucu, AM pela PETROBRÁS, exige a abertura de um grande número de clareiras na Floresta Amazônica. As áreas antropizadas são utilizadas para sondagens, descida de material, retirada do solo para construção e manutenção de estradas e para instalação de poço de extração de petróleo. Após a exploração, essas áreas apresentam intenso processo erosivo devido à ausência de manejo e conservação dos solos e de cobertura vegetal que reduza o impacto das chuvas sobre o solo desnudo (LEAL FILHO et al., 2003).

Para minimizar os impactos dessa exploração, se faz necessário o uso de técnicas para recuperação de áreas alteradas, onde uma das alternativas é o uso de espécies nativas em reflorestamentos, com o intuito de restabelecer o equilíbrio antes existente nas áreas (FERRAZ, 1998). Nesse processo de reflorestamento, a maior dificuldade está na obtenção de mudas e no estabelecimento delas no campo, sendo necessário sua produção com qualidade, quantidade e diversidade suficiente. Entretanto, a obtenção de mudas de diversas espécies do ambiente regional em quantidade suficiente para o plantio é o primeiro e um dos principais pontos de estrangulamento dos programas de restauração ecológica de determinada área (SANTARELLI, 2004). Em âmbito geral, para garantir o sucesso da recuperação de áreas degradadas, é necessário selecionar espécies vegetais rústicas, tolerantes aos períodos secos e à baixa fertilidade, e capazes de produzir grande quantidade de matéria orgânica e sementes viáveis (CARNEIRO et al., 2005).

Dentre as diversas espécies nativas utilizadas na recuperação de áreas degradadas na Amazônia, destaca-se goiaba de anta (*Bellucia grossularioides* L.). Salomão et al., (2007) em seus estudos constataram que esta espécie tem bom desenvolvimento em áreas degradadas da Amazônia e apresentou maior taxa de crescimento em diâmetro, seguida das espécies: fava camuzê (*Stryphnodendron obovatum*), muruci peluda (*Byrsonima stipulaceae*). Nesse mesmo estudo, *B. grossularioides* apresentou a terceira maior altura entre as 23 espécies nativas usadas em reflorestamentos na região.

Em relação ao uso dos nutrientes por espécies pioneiras na Amazônia, foi verificado que *B. grossularioides* possui elevado teor de nitrogênio e fósforo na parte foliar, representando níveis elevados desse nutriente na matéria orgânica proveniente dos restos vegetais dessa espécie que são depositados no solo (SANTOS Jr et al., 2006). Espécies com

características elevadas na taxa de crescimento (altura e diâmetro), menor mortalidade, elevado nível de N e P têm melhor aproveitamento na recuperação de áreas degradadas, influenciando no desenvolvimento dos novos e antigos reflorestamentos.

Bellucia grossularioides tem sido amplamente utilizada em programa de reflorestamento em áreas alteradas por produzir elevado incremento de matéria orgânica, através da deposição de folhas e ramos ricos em N e P. Porém, existem entraves ao uso da espécie como dificuldades no seu estabelecimento inicial e na germinação de sementes para produção de mudas (SANTOS Jr et al., 2006), sendo necessário estudos que possibilitem o uso massivo dessa espécie em programas de reflorestamento.

Por outro lado, o lento desenvolvimento das espécies nativas observadas em reflorestamentos em áreas impactadas negativamente, pode ser atribuído as alterações físicas, químicas e microbiológicas do solo. As perturbações sobre microrganismos podem ocasionar mudanças no comportamento da microbiota da rizosfera e zona de influência da raiz (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Essa região é rica na produção de compostos que variam em exsudados, secreções, mucilagens, mucigel e lisados (BAIS et al., 2006). A composição e a magnitude dos exsudados radiculares variam com o tipo de solo, idade e estado fisiológico da planta e com a disponibilidade de nutrientes que irão influenciar a composição da microbiota do solo e conjuntamente com a intensidade dos metabólitos das populações microbianas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Na composição da microbiota, destacam-se as rizobactérias, as quais habitam a região ao redor da raiz e atuam em diferentes processos, como na ciclagem de nutrientes (chamados de grupos funcionais do solo) e na promoção do crescimento da planta (chamados de promotores de crescimento).

Dentre os grupos funcionais, os microrganismos estão envolvidos na ciclagem de nutrientes do solo, como nitrogênio (diazotróficos, nitrificantes, desnitrificantes, amonificadores), carbono (degradadores de polímeros de carbono), degradadores de celulose (celulolíticos), amido (amilolíticos) e proteínas (proteolíticos) envolvidos no ciclo do N e C, e os envolvidos no ciclo do fósforo como os solubilizadoras de fosfato (fosfatases) (TORSVIK; OVREAS, 2002; ANDRADE, 2004).

Os grupos funcionais de microrganismos do solo estão presentes em diversos ambientes e interagem diretamente com as raízes das plantas, participando direta ou indiretamente da nutrição e, conseqüentemente de seu crescimento (MATSUMOTO et al., 2005). A grande diversidade de espécies em um grupo funcional é um mecanismo para assegurar a

continuidade dos processos biológicos, onde a perda de uma espécie é compensada pela presença de outras, que desempenham a mesma função no sistema. Participando assim intensamente nos ciclos biogeoquímicos do solo e na recuperação de áreas degradadas (KENNEDY, 1999).

As rizobactérias além de estarem envolvidas na ciclagem de nutrientes, podem promover o crescimento de plantas e por isso são chamadas rizobactérias promotoras do crescimento de plantas RPCPs. As PRCPs podem atuar diretamente na promoção do crescimento como biofertilizadoras, fitoestimuladoras, remediadoras e por redução de estresse da planta (KAMILOVA et al., 2006). Esses microrganismos podem ser utilizados em reflorestamentos por atuarem aumentando a taxa de germinação das sementes e o crescimento radicular, melhorando o desenvolvimento da parte aérea e, conseqüentemente, proporcionando maior rendimento da planta. Essas promoções devem-se à habilidade de certas rizobactérias em solubilizar e aumentar a absorção de fósforo, fixar o nitrogênio, produzir sideróforos que sequestram ferro, oxidar o enxofre e produzir compostos análogos a hormônios vegetais, como ácido-indol-acético (AIA), giberelinas, citocininas (CARDOSO; FREITAS, 1992; CATELLAN, 1999; ZAGO et al., 2000).

Patten e Glick, (2002) estudando o mecanismo de promoção de crescimento constatou que a produção de auxina, citocininas e giberelinas atuam diretamente nessa promoção. Outro mecanismo direto pode ser através da maior disponibilidade de nutrientes na rizosfera por meio da solubilização de formas indisponíveis de nutrientes e / ou a produção de sideróforos (GLICK, 1995; RODRIGUESZ; FRAGA, 1999).

Hariprasad e Niranjana (2009) isolaram e caracterizaram rizobactérias solubilizadores de fosfato, das 37 amostras de solo rizosférico, dos isolados obtidos, 43 foram solubilizadores de fosfato.

Chaiharn e Lumyong, (2009) observaram que dentre 216 isolados selecionados *in vitro* para atividades de promoção do crescimento de plantas, como solubilização de fosfato inorgânico e produção de amônia (NH_3), 100% dos isolados solubilizaram fosfato inorgânico e 77,77% produziram NH_3 .

Estudos usando parâmetros microbiológicos como RPCPs e grupos funcionais do solo pode ajudar no estabelecimento de espécies que serão utilizadas no reflorestamento, tanto na fase de viveiro quanto na fase inicial no campo. Portanto, este trabalho teve por objetivo estudar a diversidade bioquímica de rizobactérias associadas a *Bellucia grossularioides*, em áreas nativas e reflorestadas, na base de Urucu, Coari, AM.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 REFLORESTAMENTO

Durante as últimas décadas, a Amazônia vem perdendo área de floresta para pastagens, exploração predatória de madeira, plantios de grãos e exploração de petróleo e minérios (TONINI et al., 2005), que vêm provocando a degradação dessas áreas e obrigando o homem a tomar medidas de recuperação, como os reflorestamentos (GARRIDO, 1981). No entanto, a carência de conhecimentos científicos sobre o comportamento e o crescimento das espécies nativas, assim como predominância fatores microbiológicos nas diferentes condições edafoclimáticas da região, são também apontadas como dificuldades ao aumento da área reflorestada na Amazônia (MAGALHÃES et al., 1980).

O estudo científico sobre recuperação, a partir de reflorestamento, tem sido considerado como o ponto de partida do processo de recuperação de áreas degradadas, sendo que esse processo é entendido como um conjunto de ações, visando proporcionar o restabelecimento de condições de equilíbrio e sustentabilidade, existentes nos sistemas naturais (DIAS; GRIFFITH, 1998; BARBOSA, 2003).

Blum (1998) considerou que a degradação por remoção da camada vegetal pode ser entendida como a perda ou redução da energia do solo, configurando uma mudança do estado de equilíbrio, de maior para menor energia, onde os processos biológicos são alterados em alguma intensidade, isso indicado que quanto mais intensa for a ação destruidora sobre a vegetação, alterando ou eliminando a ciclagem de nutrientes, maior será a dificuldade para sua recuperação ou para a recuperação dos processos biológicos. Segundo Arato (2003), nem sempre é possível o retorno de um ecossistema degradado à sua condição original devido, entre outras causas, ao estado de degradação a que foi submetido. Um ecossistema degradado é aquele que após distúrbios, teve eliminado com a vegetação, os seus meios de regeneração biótica. Seu retorno ao estado anterior pode não ocorrer ou ser bastante lento. Nesse caso, a ação antrópica é necessária para a sua regeneração em curto prazo (CARPANEZZI et al., 1990).

Uma das estratégias usada pelo homem na recuperação de áreas antropizadas é a reposição do horizonte superficial orgânico do solo, o que favorece a disponibilidade de nutrientes para o restabelecimento de plantas e microrganismos, acelerando assim o processo de recuperação do solo (PFLEGER et al., 1994). O ponto importante para a recuperação da área degradada é a recolocação dos nutrientes essenciais que foram perdidos por erosão ou lixiviação com a retirada da vegetação. No caso das florestas, estas são sustentadas por solos muitas vezes pobres, sendo a vegetação mantida pela ciclagem de nutrientes que é a principal reserva mineral. Quando a vegetação é retirada e o ciclo é interrompido, a única reserva é a do solo, que não terá mais a adição de nutrientes e matéria orgânica (BARLOWA et al., 2007).

A matéria orgânica afeta diretamente as características biológicas do solo, atuando como fonte de carbono, energia e nutrientes para os microrganismos. A ciclagem de nutrientes em ecossistemas florestais, plantados ou naturais, tem sido amplamente estudada com o intuito de se obter maior conhecimento da dinâmica dos nutrientes (FASSBENDER, 1985).

A importância da produção de massa verde, em ecossistemas florestais, está na compreensão dos reservatórios e dos fluxos de nutrientes, os quais constitui-se na principal via de fornecimento de nutrientes, por meio da mineralização dos restos vegetais e desempenham importante papel na formação e manutenção da fertilidade destes solos e, conseqüentemente, de nutrientes para o solo degradado (BARLOWA et al., 2007).

Muitos avanços têm sido verificados nos últimos anos, no que diz respeito a reflorestamento envolvendo principalmente a dinâmica dos microrganismos na recuperação com espécies nativas (RODRIGUES; GANDOLFI, 1998; BARBOSA, 2000; SORREANO, 2002). apesar de existirem muitos modelos de repovoamento florestal com espécies nativas para recuperação de áreas degradadas, nenhum deles pode ser considerado ideal para todos os casos de degradação e todas as regiões, face ao grande número de variáveis que podem interferir no desempenho das espécies, em um determinado local (BARBOSA, 2000).

2.2 RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE PLANTAS (RPCPs)

Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs) são bactérias que vivem na rizosfera, zona influenciada pelas raízes das plantas, e que promovem crescimento quando associadas numa relação não simbiótica (NEHL et al., 1996). A rizosfera favorece as atividades microbianas liberando compostos orgânicos, ricos em açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos e outros, presentes nos exsudatos, secreções, mucilagens e mucigel (CARDOSO; FREITAS, 1992; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Os gêneros bacterianos que mais se destacam como promotores de crescimento são: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia*, *Azospirillum* e *Azotobacter* (ZAADY et al., 1993; RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999). Em sua maioria, essas bactérias são Gram-negativas (KLOEPPER, 1993).

A atuação das RPCPs na planta pode ser através do aumento na taxa de germinação das sementes e no crescimento radicular, melhorando o desenvolvimento da parte aérea (ZAGO et al., 2000). Essas promoções devem-se à habilidade de certas rizobactérias em solubilizar e aumentar a absorção de fósforo, fixar o nitrogênio, produzir sideróforos que sequestram e disponibilizam íons férricos, oxidar o enxofre e produzir compostos análogos a hormônios vegetais, como ácido-indol-acético (AIA), giberelinas, citocininas e 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) (CARDOSO; FREITAS, 1992; CATTELAN, 1999).

As rizobactérias também podem atuar como agentes de controle biológico, através da sua capacidade de produção de antibióticos (FREITAS; PIZZINATTO, 1997). Portanto, a introdução de RPCPs no solo traz benefícios diretos para o desenvolvimento da planta e, ao mesmo tempo, é uma alternativa de cultivo com menor uso de insumos agrícolas (KUREK; JAROSZUK-SCISEL, 2002). Em plantas de reflorestamento, um dos benefícios é a diminuição do período em que a muda é mantida no viveiro (BORGES et al., 2000). Para essas plantas seria aconselhável que a inoculação das bactérias fosse feita no substrato de modo que, a colonização da rizosfera e o benefício ocorressem o mais cedo possível (CHANWAY et al., 2000; STURZ; NOWAK, 2000).

As RPCPs têm sido citadas numa série de trabalhos como beneficiadoras de espécies vegetais, inclusive florestais. Sendo uma das alternativas para melhorar o estabelecimento das plantas e conseqüentemente a recuperação das áreas degradadas, seja diretamente como

promotoras de crescimento, seja como agentes de controle biológico de fitopatógenos (FREITAS; AGUILLAR-VILDOSO, 2004).

2.3 GRUPOS FUNCIONAIS

Os microrganismos estão diretamente envolvidos na ciclagem dos nutrientes no solo e, a avaliação e caracterização de determinados grupos microbianos nos levam a entender como os processos bioquímicos no solo estão ocorrendo (BROOKES, 1995; SILVEIRA et al., 2006), além de servirem como indicadores do impacto de diferentes atividades antrópicas. Com isso, destaca-se a importância dos microrganismos e seus processos no funcionamento e equilíbrio de ecossistemas (BROOKES, 1995).

Perry et al. (2004) relatam que um solo com alta diversidade de organismos de diversos grupos apresenta maior capacidade de manter os processos ecológicos em equilíbrio após um distúrbio, resultando assim na maior capacidade de recuperação desse ecossistema. A avaliação dos grupos funcionais de microrganismos pode ser usada como bioindicadores na rizosfera (ANDRADE et al., 2004).

Os microrganismos do solo podem ser classificados em grupos funcionais de acordo com os processos biológicos que realizam no ecossistema. Microrganismos envolvidos no ciclo do nitrogênio (diazotróficos, nitrificantes, desnitrificantes, amonificadores) e carbono (degradadores de polímeros de carbono), na degradação da celulose (celulolíticos), amido (amilolíticos) e proteínas (proteolíticos) e aqueles envolvidos no ciclo do fósforo (solubilizadores de fosfato inorgânico) são exemplos de grupos funcionais (TORSVIK; OVREAS, 2002; ANDRADE et al., 2004). Dentre esses ciclos, os do carbono, nitrogênio e fósforo, podem ser considerados mais importantes, porque estão envolvidos diretamente com os nutrientes que as plantas necessitam em maior quantidade para sua nutrição e crescimento (ANDRADE et al., 2004).

A ação dos grupos funcionais de microrganismos se dá através de enzimas na microbiota da rizosfera e estas atuam na decomposição de material vegetal que se apresenta depositado através de folhas mortas, galhos, frutos e flores, que se acumulam na superfície do solo, e forma uma camada de detritos orgânicos. A atividade enzimática varia tanto com a época do ano quanto com o tipo de restos vegetais. Isso indica que a atividade das enzimas no

solo depende da qualidade do substrato sobre o qual atua (DOYLE et al., 2006) e, as enzimas produzidas por esses microrganismos desempenham papel fundamental na ciclagem de nutrientes. Elas podem estar presentes em forma livre (exoenzimas produzidas e excretadas por microrganismos), ligada às estruturas celulares ou mesmo endoenzimas, que foram liberadas no solo após a morte e ruptura da célula (BADIANE et al., 2001).

As propriedades biológicas do solo determinam o estabelecimento e a produtividade das plantas e, a atividade microbiana pode ser avaliada através de parâmetros biológicos como a ação de grupos funcionais do ciclo do C, N e P (DE LUCA e KEENEY, 1993; PASCUAL et al., 2000). Estudos da diversidade microbiana em solos frequentemente enfocam as mudanças na estrutura da comunidade após situações de estresse ou alterações de manejo, porém poucos são os trabalhos abrangendo os grupos funcionais do solo (MIYAUCHI, 2007).

2.4 ATRIBUTOS MICROBIOLÓGICOS

A qualidade do solo refere-se à capacidade deste em sustentar a produtividade biológica dentro das fronteiras do ecossistema, mantendo o equilíbrio ambiental e promovendo a saúde de plantas e animais e do próprio ser humano (DORAN et al., 1996 ; SPOSITO; ZABEL, 2003). As práticas e manejos inadequados têm levado os solos do mundo todo à degradação e conseqüentemente à perda de qualidade. Portanto, a perda da qualidade do solo, além de um componente a ele inerente, determinado por suas propriedades físicas, químicas e biológicas (DORAN; ZEEIS 2000).

Karlen et al. (2003) explicam que as práticas de manejo que adicionam ou mantêm carbono orgânico no solo parecem estar entre as mais importantes para restabelecer, manter ou melhorar a qualidade do solo. Influências antrópicas podem alterar a diversidade e a funcionalidade dos microrganismos no solo (KENNEDY, 1998). A relação entre diversidade microbiana e qualidade do solo tem sido muito discutida, mas não foi ainda completamente definida (ROGERS; TATE III, 2001). Dentro desse contexto de qualidade do solo e na recuperação dos mesmos, a matéria orgânica tem grande importância, pois o acúmulo de matéria orgânica no solo tem como principal responsável a deposição de materiais orgânicos no solo provenientes da vegetação, formando o que chamamos de serrapilheira. Das variáveis climáticas, a precipitação e a temperatura são as que exercem maior influência na formação da

serrapilheira. Portanto pode se concluir que o tipo de vegetação e as condições ambientais são fatores determinantes da quantidade e qualidade do material que cai no solo, determinando a heterogeneidade e a taxa de decomposição do material depositado na superfície (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

A importância da matéria orgânica do solo (MOS) aumenta em ecossistemas de floresta tropical, que apresentam solos pobres em nutrientes e onde a vegetação depende em grande parte da reciclagem de nutrientes contidos nos detritos vegetais (HERRERA, 1985).

O processo de decomposição da matéria orgânica tem grande influência da biomassa microbiana (BM) é a parte viva da matéria orgânica do solo e funcionalmente, atua como agente de transformação da matéria orgânica no ciclo de nutrientes e no fluxo de energia, representando um importante compartimento de armazenamento de carbono e nutrientes no solo de agroecossistemas (WARDLE, 1992).

O estudo da biomassa microbiana e sua atividade no solo têm implicações importantes na agricultura, pois estes são indicadores sensíveis às mudanças decorrentes do uso do solo. A biomassa microbiana é considerada a parte viva e mais ativa da matéria orgânica do solo, constituída por fungos, bactérias, actinomicetos, protozoários, algas e microfauna (DEPOLLI; GUERRA, 1999). Mudanças significativas na quantidade de biomassa podem ser detectadas muito antes que alterações na matéria orgânica total possam ser percebidas, possibilitando a adoção de medidas de correção antes que a perda da qualidade do solo seja mais severa. A respiração basal (RB), também denominada carbono prontamente mineralizável, é um dos métodos mais utilizados para avaliar a atividade metabólica da população microbiana do solo.

A RB do solo reflete tanto a atividade de microrganismos aeróbios quanto anaeróbios e depende do estado fisiológico da célula, pois é influenciada por diversos fatores do solo, tais como umidade, temperatura e disponibilidade de nutrientes (ALEF, 1995).

A combinação das medidas de carbono da biomassa microbiana (CBM) e RB fornecem a quantidade de CO₂ liberada por unidade de biomassa, denominada quociente metabólico ou respiratório (qCO₂). O qCO₂ indica a eficiência da biomassa microbiana em utilizar o carbono disponível para biossíntese, sendo indicador sensível para estimar a atividade biológica e a qualidade do substrato depositado no solo, assim como, parâmetro de avaliação da recuperação de um solo degradado (SAVIOZZI et al., 2002).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO E COLETA

As áreas de coletas pertencem à base petrolífera da PETROBRÁS S/A, denominada de UNBSOL (Unidade de Negócios da Bacia do Solimões), localizada às margens do Rio Urucu, no município de Coari, distante cerca de 650 km de Manaus/AM. O local do experimento, apresentou os seguintes dados meteorológicos em 2008, nos meses das coletas (TABELA 1):

Tabela 1 – Dados de Precipitação do período seco e chuvoso, Temperatura média, Umidade relativa (%), em áreas de mata nativa, clareira e jazidas reflorestadas, nos períodos chuvoso e seco, da Base Petrolífera de Urucu, Coari-AM, 2008.

	SECO (Junho)	CHUVOSO (Dezembro)
PRECIPITACAO, MENSAL (mm)	98,80	331,80
TEMPERATURA MEDIA (°C)	25,82	26,40
UMIDADE RELATIVA (%)	78,71	80,90

Fonte: INMET, 2008 (Instituto Nacional de Meteorologia).

Foram coletados nas camadas de 0-20 cm de profundidade, solos rizosférico da espécie goiaba de anta (*B. grossularioides* L), no período seco (junho de 2008) e chuvoso (dezembro de 2008), em 14 áreas, descritas a seguir:

Sete áreas de mata (matas adjacentes às clareiras 01, 02 e 03 e matas adjacentes as jazida 02, 19, 22 e 60) descritas como florestas de terra firme, sempre verde e com dossel fechado.

Quatro áreas de jazidas reflorestadas (jazidas 02, 19, 22 e 60); descritas como áreas reflorestadas nas quais foram retirados os horizontes A e B (utilizados para construção civil). Essas áreas foram as que sofreram maior nível de impacto durante a exploração e com onze anos em recuperação.

Três áreas de clareiras reflorestadas (clareiras 01, 02 e 03); descritas como áreas na quais a vegetação foi retirada para dar acesso a equipamentos e pessoas às áreas de exploração petrolífera e possui em média quatro anos em recuperação com reflorestamento.

Tabela 2 – Dados de fertilidade do solo das áreas de mata nativa, clareira e jazidas reflorestadas, da Base Petrolífera de Urucu, Coari-AM, 2008.

Área	Prof.	pH	P	K	Na	Ca	Ca+Mg	Al	H + Al	N
	cm	água	mg/dm ³		cmol/dm ³					g/kg
Mata	0-5	4,59	81,63	21,88	0,71	1,13	3,24	10,79	0,49	42,57
Clareira	0-5	5,13	82,52	26,28	2,71	3,32	2,52	6,18	0,32	23,74
Jazida	0-5	5,16	62,56	19,63	2,28	2,77	4,06	8,85	0,23	23,82

Fonte: Laboratório de solos ufra.

3.2 TRANSPORTE E ARMAZENAMENTO DO MATERIAL COLETADO

O material coletado foi transportado em sacos plásticos, estéreis, acomodados em isopor de 60L e enviado para o Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Belém/PA. Os solos foram mantidos por até duas semanas sob refrigeração a $\pm 4^{\circ}\text{C}$.

3.3 ISOLAMENTO, SELEÇÃO E PRESERVAÇÃO DAS RIZOBACTÉRIAS

Para o isolamento das rizobactérias, foram pesados 10 gramas de cada amostra de solo e diluídas em 90 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85%). A solução de solo obtida foi agitada por 10 minutos até se tornar uma suspensão homogênea. Posteriormente, cada suspensão foi submetida ao método de diluição seriada, até a concentração de 10^{-6} , plaqueando-se 100µl da suspensão de solo em placas de Petri contendo meio 523 de Kado; Heskett (1970) e espalhada com auxílio de alça de Drigalski. As bactérias foram incubadas a 28°C e após 24 horas foi realizada a contagem das colônias na diluição onde as mesmas encontravam-se isoladas e passíveis de serem contadas. O número de UFC g^{-1} .solo foi obtido pela fórmula: $\text{UFC} = \text{número médio de colônias} \times \text{fator de diluição} \times 10$. A seleção das colônias foi realizada com base na observação da morfologia dos isolados. Os isolados obtidos foram preservados em microtubos (1,5 mL) contendo glicerina a 10% e armazenados sob refrigeração a 5°C .

As rizobactérias isoladas foram submetidas à caracterização fenotípica: tempo de crescimento das colônias, teste Gram/teste de KOH, formato da colônia, coloração, morfologia celular e fluorescência; caracterização bioquímica associada à promoção do crescimento: produção de ácido indol acético (AIA), sideróforos, citocininas e giberelinas. e atividade enzimática: fixação de nitrogênio (BFN); atividades celulolíticas; proteolíticas e amilolíticas, solubilização de fosfato (SF) e fosfatase ácida (FAC).

Foram estimados os parâmetros microbiológicos respiração basal (RB), carbono da biomassa microbiana (CBM) e Quociente metabólico (qCO^2), das três áreas anteriormente descritas.

3.4 DETERMINAÇÃO DOS ATRIBUTOS MICROBIOLÓGICOS

3.4.1 Determinação do carbono da biomassa microbiana (CBM)

O carbono da biomassa microbiana (CBM) foi determinado pelo método da fumigação-extração (VANCE et al., 1987). Para cada amostra, foram pesadas duas sub amostras de 25g cada, sendo uma amostra fumigada e a outra não fumigada que foi utilizada como controle. Para a fumigação utilizou-se um dessecador contendo um becker com clorofórmio. O clorofórmio foi evaporado sob o vácuo. Após um período de 24 horas, procedeu-se a retirada do resíduo de clorofórmio do dessecador. Após a fumigação, ambas as amostras receberam então, 40 ml de K_2SO_4 0,5 mol L⁻¹, sendo agitadas por 30 minutos. A suspensão resultante foi filtrada em papel filtro Whatman nº 1. O carbono orgânico dos extratos foi determinado pela digestão de 10mL do filtrado com 1 mL $K_2Cr_2O_7$ e 10mL de uma mistura de H_2SO_4 e H_3PO_4 concentrado (1:1), em erlenmeyers de 50mL. Após de resfriadas, as amostras receberam 10mL de H_2O deionizada. O excesso de $K_2Cr_2O_7$ foi determinado por titulação com sulfato ferroso de amônio, utilizando-se difenilamina como indicador. Para saber a quantidade de dicromato consumida fez-se uma digestão em branco, utilizando todo o processo sem solo. O carbono orgânico extraído de cada amostra foi determinado da seguinte maneira:

$$CBM = (F - NF) / Kc, \text{ Onde:}$$

F= amostras fumigadas;

NF = amostras não fumigadas;

Kc = coeficiente de correção 0,30 proposto por Feigl et al. (1995).
Os resultados foram expressos em: $\text{mg C g}^{-1} \text{ solo}$

3.4.2 Respiração Basal

A respiração basal (RB) do solo foi determinada através da quantificação de dióxido de carbono (CO_2) liberados no processo de respiração microbiana, durante 10 dias de incubação. Das amostras coletadas retirou-se o equivalente a 25g de solo, que foram encubados em frascos de vidro com tampa vedante, contendo um frasco com 10 mL de solução de NaOH 0,05 M para absorver o CO_2 liberado do solo.

Após 24 horas de incubação a 28°C retirou-se o frasco com a solução de NaOH e adicionou-se 1 mL de BaCl_2 e três gotas de indicador fenolftaleína. A quantidade de CO_2 liberado do solo foi determinado após titulação do excedente de NaOH com solução de HCl 0,05 M. O calculo da respiração utilizou-se o seguinte calculo:

$$\text{CO}_2 (\text{mg}) \text{ SS/t} = (V_0 - V) * 1.1) / \text{Ps} , \text{ onde:}$$

SS = Peso de solo seco.

t = tempo de incubação (horas)

V_0 = Volume de HCl usado para titulação de testemunha sem amostras (mL)

V = Volume de HCl usado para titulação da amostras de solo

Ps = peso seco de 1 grama de solo úmido

1.1= fator de conversão (1 mL 0.05 M NaOH = 1.1 mg CO_2)

Resultados expressos em: $\text{mg CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$

3.4.3 Determinação do quociente metabólico ($q\text{CO}_2$)

O quociente metabólico foi determinado como proposto por Anderson & Domsch, (1993) na qual a $q\text{CO}_2$ e obtido da razão entre (respiração basal):(biomassa microbiana).

Os resultados foram expressos em: $\mu\text{g CO}_2 / \mu\text{g C g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$

3.5 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

Para caracterização fenotípica, as colônias bacterianas foram crescidas por 24 horas em meio 523 de Kado e Hesketh (1970). Foram realizados os métodos de coloração gram e o teste de solubilidade em KOH 3%, para diferenciar bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A morfologia da colônia foi feita por esfregaço, coloração e visualização em microscopia de luz (100 x) (ROMEIRO, 2001). Para o tempo de crescimento dos isolados, as colônias foram classificadas em: crescimento rápido (um dia); crescimento intermediário (dois dias) e crescimento lento (três dias).

Para a determinação das características morfológicas foi usada a classificação utilizada por Klement et al., (1990). Descrita a seguir:

Cor da colônia: branca, creme, creme escuro, amarelo, amarelo-escuro, vermelha;

Forma: puntiforme, circular, irregular, rizóide, fusão;

Elevação: achatada, elevada, convexa, ondulada;

Superfície: lisa, rugosa;

Bordo: inteiro, ondulado, lobado, erosado;

Consistência: viscosa ou pegajosa, seca, aquosa, gomosa.

3.5.1 Avaliação de fluorescência das colônias

A capacidade de produzir pigmento fluorescente, foi realizada em placas de Petri contendo meio B de King, onde as rizobactérias foram semeadas e incubadas por 24 horas a 28°C. Após esse período, as colônias foram examinadas em câmara escura, sob luz ultravioleta com comprimento de onda de 365 nm. A presença de fluorescência caracterizou o isolado como produtor desse pigmento (MARIANO; KLOEPPER, 2000).

3.6. CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Para cada tipo de caracterização enzimática foram usados meios específicos, sendo semeados cinco isolados bacterianos por placa, através de *replica plite*, em duplicata e procedendo às seguintes avaliações:

3.6.1 Isolados amilolíticos

A determinação dos isolados amilolíticos, foi verificada em meio específico para produção de amilase (amido solúvel 10g; extrato de levedura 0,1g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05g ; KH_2PO_4 1,5g ; NH_4NO_3 0,1g ; ágar bacteriológico 15g ; NaCl 0,85% 50 mL; extrato de solo 950 mL (substituiu a água destilada). As bactérias foram incubadas a 28°C e após três dias foi realizada a avaliação da produção de amilase pelos isolados, adicionando-se uma solução de lugol 10% sobre as colônias e observado a presença ou ausência de halo de degradação. As colônias bacterianas onde os halos foram destacados ao seu redor, devido a reação do meio com o iodo presente no lugol, foram consideradas positivas para produção da enzima amilase.

3.6.2 Isolados celulolíticos

A verificação da produção de celulase ocorreu após três dias de incubação dos isolados a 28°C) em meio contendo carboximetil celulose 5,0g; NH_4NO_3 1,0g; ágar bacteriológico 15,0g ; NaCl 0,85% 50 mL e extrato de solo 950 mL, em pH 7,0. A constatação da atividade celulolítica dos isolados foi realizada com a adição de uma solução de NaCl [1M] sobre o meio por cinco minutos, sendo em seguida descartada e adicionada uma solução de Vermelho Congo [0,1%] por 30 minutos. A presença de halo ao redor das colônias, no final do processo, indicou atividade celulolítica do isolado (WOOD, 1980).

3.6.3 Isolados proteolíticos

Foi verificada a formação de halo translúcido ao redor da colônia, após três dias de incubação dos isolados, em meio específico para produção de proteases (caseína hidrolisada 10,0g; extrato de levedura 0,1g; K_2HPO_4 1,5g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5g; ágar bacteriológico 15,0 g; NaCl 0,85% 50 mL; extrato de solo 950 mL; pH 7,0. Os isolados que apresentaram halo foram considerados proteolíticos (WOOD, 1980).

3.6.4 Bactérias fixadoras de nitrogênio NFB

A capacidade de bactéria de fixar nitrogênio foi avaliada em meio de cultura contendo KH_2PO_4 0,4g; K_2HPO_4 0,1g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2g; NaCl 0,1g; $CaCl_2$ 0,02g; $FeCl_3$ 0,01g; $MoO_4Na \cdot 2H_2O$ 0,002; malato sódico 5,0g; azul de bromotimol (solução alcoólica 0,5%) 5mL; ágar bacteriológico 15g e pH 7,0, ajustado com KOH. Após três dias de incubação das rizobactérias a 28°C foi verificada a presença ou ausência de halos de coloração azul, destacados da coloração verde característica do meio específico utilizado. Os isolados que apresentaram coloração azul ao redor da colônia, foram considerados positivos para a fixação de nitrogênio (DOBEREINER; DAY, 1976).

3.6.5 Isolados solubilizadores de fosfato

Utilizou-se o meio GL acrescido da fonte de fósforo $CaHPO_4$ formada a partir de 50mL de solução K_2HPO_4 [10%] e 100mL de $CaCl_2$ [10%]. A avaliação foi realizada após três dias de incubação a 28°C. Os isolados com formação de halo translúcido ao redor da colônia foram considerados positivos para solubilização de fosfato (SYLVESTER-BRANDLEY et al., 1982).

3.6.6 Atividade de fosfatase ácida

Foram pesado 100 mg de solo rizosférico de *B. grossularioides* e adicionado 0,4 mL de Tampão Mac Ilvaine ($\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (0,1 M) e $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (0,2 M) ajustado o pH a 4,0). O substrato utilizado foi o PNPP (1%) em todas as amostras, com exceção das amostras controle e nestas colocadas somente 0,1 mL de água.

O solo foi colocado para agitar e incubar por 1 hora, a 37°C e 275 rpm. Decorrido este tempo foi colocado 0,1 mL de CaCl_2 (0,5 M), 0,4 mL de NaOH (1N) em todas as amostras. Nas amostras controle foi adicionado ainda 0,1 ml de PNPP (Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate 1%) e 0,1 mL de água nas outras amostras.

Em seguida todas as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm durante 5 min., pipetado o sobrenadante e lido em espectrofotômetro a 400nm e comparados com a amostra controle e o resultado expresso em μg^{-1} p-nitrofenol. g^{-1} solo.

3.6.7 Produção de AIA

Colônias bacterianas foram transferidas para placas de Petri contendo meio 1/10 de TSA (Trypticaseína de Soja Ágar) suplementado com 5 mM de L-triptofano, cobertas com membrana de nitrocelulose e incubadas a 28°C por 24 horas. Após esse período, a membrana foi removida para outra placa e saturada com solução de Salkowski (GORDON e WEBER, 1951). Os isolados que apresentaram halo avermelhado na membrana, no período de duas horas, foram considerados positivos para a produção de AIA (BRIC et al., 1991 ; adaptado por CATTELAN, 1999).

3.6.8 Produção de citocininas e giberelinas

Foram germinadas sementes de rabanete em gerbox, contendo folhas de papel de filtro umedecidas, incubadas no escuro a 25° C por 35 horas e após a germinação foi destacado o cotilédone menor e separado os hipocótilos.

Colocou-se oito cotilédones de tamanho uniforme em placas de Petri com papel de filtro umedecido com 3 mL do sobrenadante da suspensão bacteriana de cada isolado a ser testado. Os hipocótilos foram uniformizados para 3mm de comprimento, sendo colocados logo abaixo dos cotilédones nas placas com o sobrenadante dos isolados. As placas foram mantidas incubadas por 24 °C sob luz fluorescente, durante três dias. Após esse período, foram comparados os pesos dos cotilédones e os comprimentos dos hipocótilos de rabanete, com o do tratamento controle, na qual não foi inoculado o sobrenadante da suspensão bacteriana e sim uma solução tampão de fosfato. Os sobrenadantes das bactérias que produziram citocininas aumentaram o peso dos cotilédones; já os produtores de giberelinas aumentam o comprimento do hipocótilo (LETHAM 1971; adaptado por CATTELAN, 1999).

3.7 ANÁLISE DOS DADOS

Os valores de UFC, transformados para $\log(x+1)$ e de biomassa microbiana foram submetidos ao teste de Tukey a 5% de significância (PROGRAMA..., 2008).

Para comparação de similaridade utilizou-se as características fenotípicas dos isolados para o agrupamento. Os dendrogramas foram construídos a partir de uma matriz binária pelo método UPGMA (método da média aritmética não ponderada), com a utilização do coeficiente de Jaccard, no programa estatístico NTSYS (Numerical Taxonomic and Multivariate Analysis System, version 2.0, Applied Biostatistics, New York).

Com os grupos fenotípicos dos isolados foi calculado o índice de diversidade de Shannon (H) para as diferentes áreas de estudo por meio da fórmula $H = - \sum (p_i \ln p_i)$, onde p_i = abundância relativa dos isolados em cada grupo (GOODWIN, 1997).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.

4.1. DENSIDADE DE RIZOBACTÉRIAS ASSOCIADAS A *BELLUCIA GROSSULARIOIDES*

A maior densidade de rizobactérias (UFC g^{-1} .solo), associadas à *B. grossularioides* ocorreu no período chuvoso quando comparado ao período seco (Figura 1).

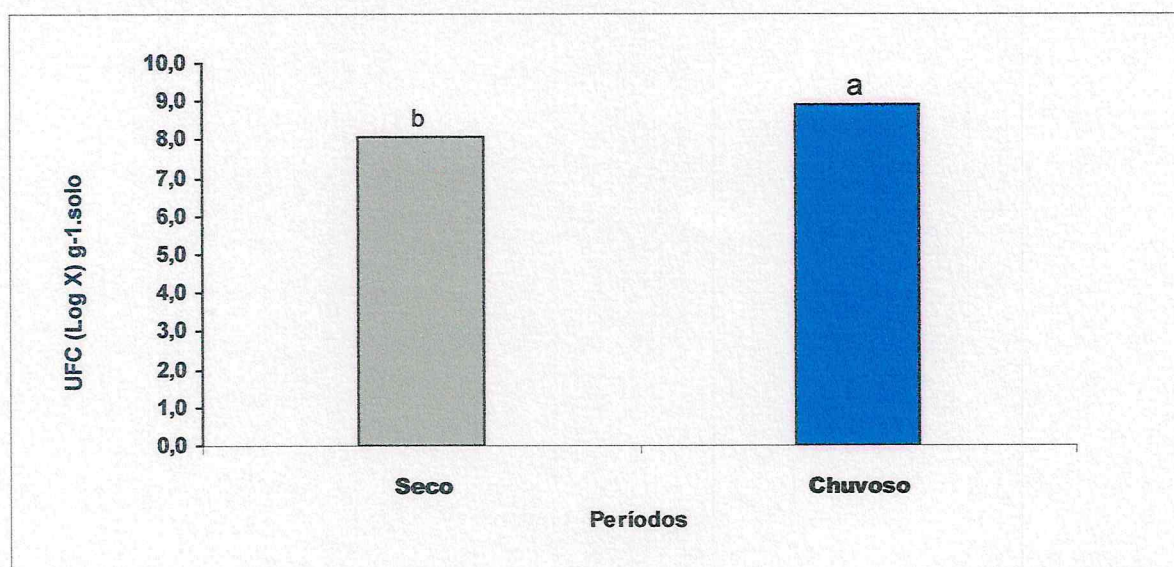


Figura 1 - Densidade de rizobactérias associadas a *Bellucia grossularioides*, proveniente de 14 áreas da floresta Amazônica durante o período chuvoso e seco, na Base de Urucu-Coari-AM, 2008. Valores UFC (Unidade formadora de colônias) transformados para $\log(x+1)$ de UFC g^{-1} solo. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Indicando que a umidade do solo pode influenciar a população das rizobactérias, através da formação de um microclima favorável para o desenvolvimento dessas. Resultados semelhantes foram demonstrados por Sales et al. (2008) em trabalhos de diversidade de microrganismos realizados na mesma área deste estudo.

Os resultados da comparação entre áreas estudadas, no período chuvoso, mostram diferenças estatísticas entre elas, onde as matas, de um modo geral, são as áreas que apresentaram maior UFC ($9,35 \text{ g}^{-1}$.solo), durante esse período (Figura 2). Isso provavelmente deve-se ao fato de que a área de mata constitui um ambiente mais equilibrado, com estrutura de solo que permite a infiltração da água mesmo com elevada precipitação pluviométrica, da chuva. Por outro lado nas áreas de jazidas e clareira apresentam-se elevada compactação do solo, o que reduz a população de rizobactérias aeróbicas. Melo e Azevedo (1997),

encontraram resultados similares em estudos da diversidade de microrganismos na rizosfera, onde também constatou maior diversidade nas áreas de mata nativa, quando comparado a sistemas agrícolas, no período chuvoso.

Condições distintas do solo sob vegetação nativa, juntamente com a ausência de perturbações decorrentes de atividade antrópicas, tornam possível a existência de maiores diversidades microbiana na área de floresta, indicando o maior equilíbrio da microbiota do solo nesse ecossistema durante o período de alta precipitação (D'ANDREA et al., 2002).

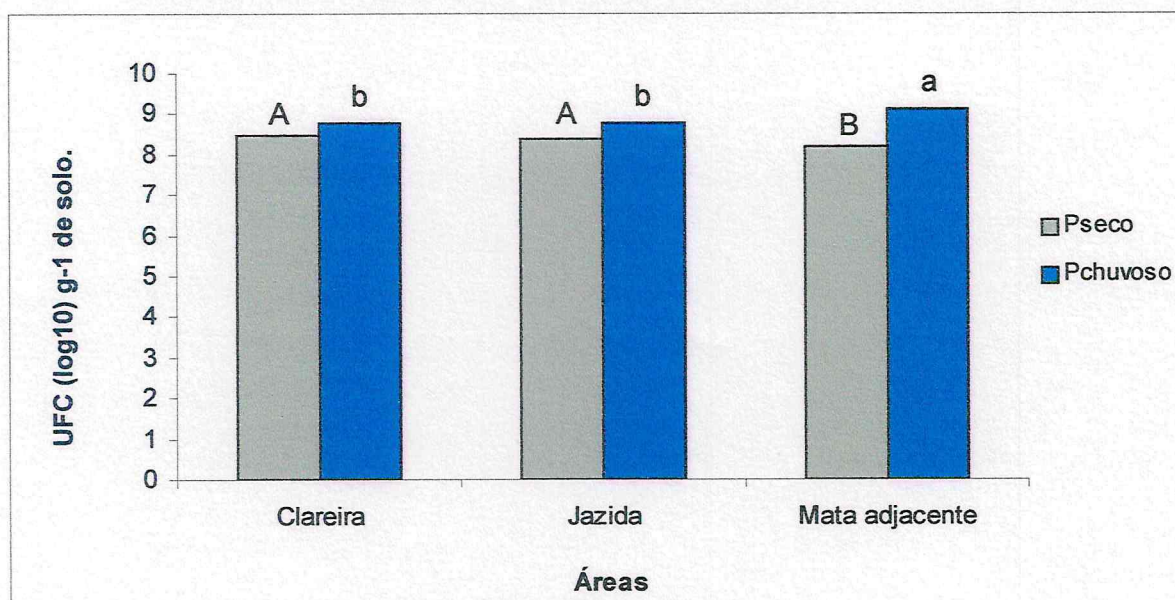


Figura 2 - Densidade de rizobactérias associadas a *Bellucia grossularioides*, proveniente de 14 áreas da floresta Amazônica durante o período chuvoso e seco, na Base de Urucu-Coari-AM, 2008. Valores UFC (Unidade Formadora de colônias) transformados para $\log(x+1)$ de UFC g⁻¹.solo. Médias seguidas de mesma letra maiúsculas não diferem entre si no período chuvoso e medias seguidas de mesmas letras minúsculas não diferem entre si no período seco, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Com relação ao período seco, o comportamento foi diferenciado, as áreas de reflorestamento clareira e jazida apresentaram a maior densidade de rizobactérias (Figura 2). Nesse período, a pluviosidade é menor em comparação com a estação chuvosa, na Região Amazônica. Diaz-Ravina et al. (1995) afirmam que a falta de água é mais limitante para os microrganismos no solo, do que a variação de temperatura. Verifica-se que nas áreas impactadas, clareira e jazidas, ocorrem significativas flutuações de UFC.g-1 de solo entre as estações distintas do ano, seca e chuvosa. Essas alterações da densidade de rizobactéria obtida podem ser devido às características dos restos vegetais, exsudados radiculares mais concentrados em substâncias estimuladora da população de rizobactérias presentes nas áreas de clareira e jazida, que favoreceram o desenvolvimento desses microrganismos. Estudos realizados por Balota (2004) indicam que adições e acúmulo de material vegetal em sistemas

em recuperação com tempo superior a três anos, já estejam sendo suficientes para atender à demanda e manutenção dos microrganismos existente em áreas em processo de recuperação durante o período seco.

4.2 ATRIBUTOS MICROBIOLÓGICOS DO SOLO, RESPIRAÇÃO BASAL (RB), CARBONO DA BIOMASSA MICROBIANA (CBM), QUOCIENTE METABÓLICO (QCO_2).

Não houve diferença estatística na comparação das épocas do ano (período chuvoso e seco), em relação aos parâmetros analisados, quando comparados aos valores obtidos de RB, CBM e QM (Tabela 2). Variações sazonais sobre os parâmetros em questão, não são esperadas em solos sob vegetação natural e mesmo em sistemas florestais, onde as variações ocorrem a longo prazo (ARAUJO, 2005).

A maior respiração basal (RB) foi observado nas áreas de mata nativa, em ambos os períodos, chuvoso ($244.90 \text{ mg CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$) e seco ($179,48 \text{ mg CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ solo h}^{-1}$). Nas áreas impactadas, os valores de RB foram menores, aproximadamente em 50% para clareiras e de 62% nas jazidas em relação aos obtidos nas áreas de mata (Tabela 2). Guedes (2005) obteve resultados semelhantes, com valores superiores de CBM e RB nas áreas de mata em relação ao reflorestamento com pinus.

Os valores de RB no solo podem variar em função das formas de uso da terra. (PAUL, 2002). Segundo Spaccini et al., (2001) os valores de RB devem ser maiores na área de mata do que em áreas reflorestadas e agrícolas, pois áreas nativa constitui-se em um ambiente mais equilibrado e com maior quantidade de microorganismos e deve ser sempre adotado como referência para sistemas reflorestados e agrícolas, que possuem menor equilíbrio. Iziquierdo et al., (2005) encontraram em áreas reflorestadas, com seis anos de idade, maiores valores de RB em comparação a sistemas agrícolas, resultado da maior cobertura vegetal. Isso demonstra que com o passar do tempo a RB vai se tornando similar ao da mata nativa.

Tabela 3 – Respiração basal (RB), carbono da biomassa microbiana (CBM) e quociente metabólico (QM) de solos rizosféricos da espécie *Bellucia grossularioides*, na camada 0-10cm, em área de mata nativa, clareira e jazidas, nos períodos chuvoso e seco, da Base Petrolífera de Urucu, Coari-AM, 2008.

ÁREAS	Período chuvoso			Período Seco		
	(RB) mg CO ₂ g ⁻¹ solo h ⁻¹	(CBM) mg C g ⁻¹ solo	(QM) µg CO ₂ / µg C g ⁻¹ solo h ⁻¹	(RB) mg CO ₂ g ⁻¹ solo h ⁻¹	(CBM) mg C g ⁻¹ solo	(QM) µg CO ₂ / µg C g ⁻¹ solo h ⁻¹
Mata	244.90 a	1.07 a	0,001024 a	179.48 a	1.09 a	0,000759 a
Clareira	127.18 b	0.55 b	0,000950 a	112.30 b	0.57 b	0,000896 a
Jazida	91.66 b	0.50 b	0,000782 a	89.75 b	0.51 b	0,000871 a

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

A área de mata também apresentou maior valor de carbono da biomassa microbiana (Tabela 2). Segundo Nayak et al. (2007), a biomassa microbiana aumenta com o aumento do teor de carbono, depositado no solo com o acréscimo de material vegetal, mas diminui em sistemas agrícolas e reflorestados devido ao inadequado suprimento de nutrientes, prejudicando assim os microrganismos da rizosfera. Por outro lado, foi verificado que reflorestamentos manejados e com espécies nativas quando comparados com áreas de mata nativa podem não diferir quanto ao carbono da biomassa microbiana, o que não ocorre com o reflorestamento com espécies exóticas, no qual ocorre redução da biomassa (RUTIGLIANO et al. 2004; MIYAUCHI, 2007). Contudo, os resultados encontrados neste trabalho revelaram que embora tenha sido utilizada uma espécie originária da Amazônia, *B. grossularioides*, para o reflorestamento, a biomassa obtida foi inferior nessas áreas, em relação à mata nativa, indicando possivelmente o alto grau de impacto nas áreas associado a baixa qualidade do manejo do solo. Souza (2005) obteve biomassa microbiana 28% a mais na área de mata do que em comparação com a reflorestada, relacionando esse resultado à qualidade da serrapilheira depositada na área de mata nativa.

Os resultados do quociente metabólico (qCO_2) não apresentou a mesma tendência dos atributos discutidos acima, ou seja, a mata nativa apresentou valores semelhantes quando comparado as demais áreas estudadas, não diferindo significativamente também em nenhum dos períodos. Isso demonstra que as áreas reflorestadas, apresentam eficiência na utilização do carbono pelos microrganismos semelhante à mata nativa, considerada como referência nesse estudo.

Insam e Domsch (1998); Carvalho (2005), relatam que, na medida que a biomassa microbiana de um determinado sistema se torna mais eficiente, menos carbono é perdido pela respiração, tendo um qCO_2 menor.

Esses resultados são similares aos encontrados por Carvalho (2005), que encontraram qCO_2 semelhante em áreas reflorestadas quando comparadas com áreas de mata de araucária. Contudo o estudo realizado por Mader et al. (2002) encontraram resultados opostos aos encontrados nesse estudo, onde a mata nativa apresentou os menores valores de qCO_2 , sendo considerada mais eficiente na utilização de carbono quando comparada as áreas reflorestadas.

4.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

4.3.1 Bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN)

Na avaliação da BFN (**Figura 4**) presente na rizosfera de *B. grossularioides*, o período chuvoso apresentou maior densidade de rizobactérias fixadoras de nitrogênio para todas as áreas do estudo, em comparação ao período seco (**Figura 3**). Isso demonstra que a maior umidade favoreceu esse tipo de rizobactérias em todos os sistemas avaliados.

Em relação às áreas, a maior porcentagem de BFN foi encontrada na área de clareira, em ambos os períodos, quando comparadas com as áreas de mata e jazidas. Do total de rizobactérias isoladas da rizosfera, 92% e 78% foram positivas para fixadoras de nitrogênio, *in vitro*, nos período chuvoso e seco, respectivamente, nas áreas de clareira.

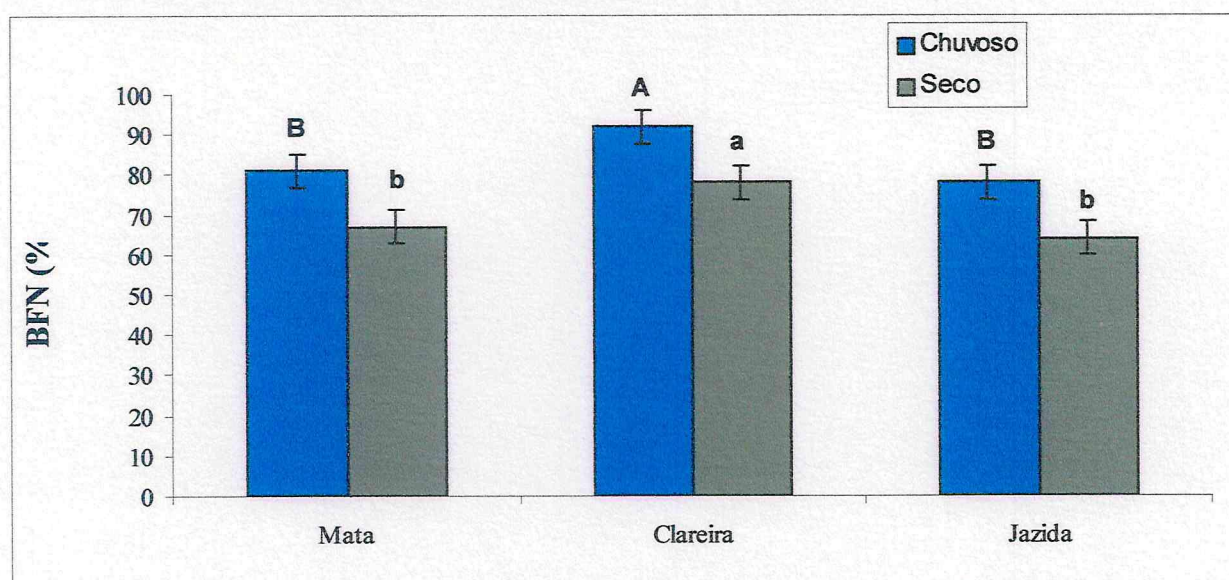


Figura 3 - Rizobactérias fixadoras de nitrogênio (%) associadas a *Bellucia grossularioides*, proveniente de 14 áreas da floresta Amazônica durante os períodos chuvoso e seco, na Base Petrolífera de Urucu, Coari/AM, 2008. Médias seguidas de mesma letra maiúsculas não diferem entre si no período chuvoso e médias seguidas de mesmas letras minúsculas não diferem entre si no período seco, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. As barras do intervalo de confiança diferem os dois períodos numa mesma área.

Patrício et al. (2005) concluíram que nos estágios iniciais de degradação os níveis de diversidade de bactérias diminuí drasticamente, no entanto, Moreira e Costa (2007), verificaram que a partir dos primeiro ano de reflorestamento ocorre um aumento significativamente no teor de matéria orgânica nas mesmas áreas de clareira utilizadas nesse trabalho. Provavelmente, o aumento da matéria orgânica favoreceu o aumento das bactérias fixadoras de nitrogênio, independente da época do ano. Os resultados encontrados demonstram que a interação entre os fenômenos decorrentes do processo de recuperação da diversidade desses microrganismos, provavelmente atua dependendo de fatores nutricionais (ZHANG et al., 2006). Essa rápida recuperação na diversidade desse grupo funcional pode ser explicada, em parte, pelo amplo espectro de populações que atuam nesse nicho. Da mesma forma, concluiu Donzeli (2006), estudando esse grupo de rizobactérias em solos após o processo de solarização.

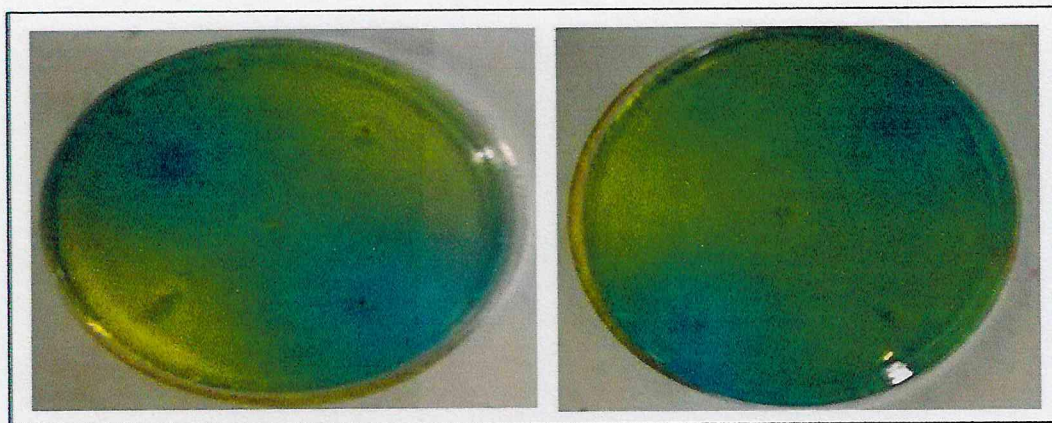


Figura 4 - Bactérias fixadoras de nitrogênio in vitro por rizobactérias isoladas da rizosfera de *B. grossularioides*, 2008.

4.3.2 Atividade enzimática do ciclo do carbono

A maior porcentagem de rizobactérias degradadoras da Celulose (**Figura 6-A**) foram encontradas no período seco nas áreas de jazidas (75%), seguida de clareiras (60%) e mata (42%) (**Figura 5-A**). Nas áreas impactadas houve diferença significativa entre períodos, sendo maior no seco do que no chuvoso. Por outro lado, os resultados para as áreas de mata não mostram essa diferença entre os períodos, indicando que as alterações nas condições de

temperatura e umidade do solo exercem influencia maior sobre as rizobactérias do ciclo do carbono nas áreas alteradas do que em mata, onde encontra-se em equilíbrio.

As rizobactérias proteolíticas(**Figura 6-B**) foram encontradas em maior número no período seco (>80%), independente da área de coleta (**Figura 5-B**). No período chuvoso a porcentagem de rizobactérias foi maior na área de mata (78%) seguida de jazida (72%), as quais diferiram significativamente de clareira (50%). Novamente, as áreas alteradas apresentaram diferenças entre os períodos para uma mesma área, no qual o período seco apresentou maior porcentagem. E da mesma forma que ocorreu para os celulolíticos, não houve diferença nos períodos dentre as áreas e mata.

O resultado obtido para a produção da enzima amilase (**Figura 5-C**), mostrou que durante o período chuvoso, a porcentagem desse tipo rizobactéria, nas áreas de mata e jazidas são semelhantes, apresentando 50% dos isolados com capacidade de produzir amilase (**Figura 6-C**). Com relação ao período seco, a área de jazida apresentou maior porcentagem (87%) das rizobactérias isoladas dessa área. Independente da época do ano, as áreas de jazidas apresentaram maior porcentagem de amilolíticos em relação às outras áreas estudadas.

De um modo geral, os resultados encontrados para a atividade enzimática de rizobactérias envolvidas no ciclo do carbono, mostrou que no período seco apresentou os melhores valores para todas as áreas e atividades enzimáticas testados (**Figura 4**). Demonstrando que o excesso de chuva e umidade durante o período chuvoso afeta, de certa forma, a diversidade das rizobactérias desse ciclo.

O período seco mostrou que as áreas de jazidas apresentaram maior número de isolados celulolíticos e amilolíticos, enquanto que o percentual de rizobactérias proteolíticos não diferiram estatisticamente entre si, em relação às áreas avaliadas. Isso pode ser explicado pela época do ano que, provavelmente, favoreceu esses tipos de rizobactérias do ciclo do carbono e pelo tipo de material vegetal proveniente da *B. grossularioides* encontrado na área de jazida, 11 anos em recuperação, isso embora as jazidas tenham sofrido maior impacto, pela retirada dos horizontes A e B do solo, demonstra que em relação aos grupos de rizobactérias do ciclo do carbono possui maior capacidade de recuperação dos microrganismos desse nicho ecológico. Em seus estudos Anderson et al. (2004) constataram que a maior diversidade de microrganismos celulolíticos ocorrem onde os resíduos das plantas são mais favoráveis a esse tipo de atividade enzimática. Nayak et al. (2007), constataram que a maior oferta de um substrato específico pode favorecer esse grupo. O que pode estar sendo fornecido pelas espécies vegetais presentes nas áreas de jazida.

Levando em consideração que o maior percentual de isolados celulolíticos e amilolíticos ocorreu nas áreas de jazidas, isso nos leva a crer que a área em questão possui, portanto, maior diversidade de microrganismos ligados ao ciclo do carbono, tendo em vista que essas rizobactérias são participantes diretas desse ciclo no solo. Kennedy (1999) observou que a grande diversidade de espécies de um grupo funcional em uma mesma área pode ser interpretada como um mecanismo para assegurar a continuidade dos processos biológicos, onde a perda de uma espécie seria compensada pela presença de outras, que desempenhariam a mesma função no sistema.

No período chuvoso, as áreas de mata apresentaram maiores percentuais de isolados dos grupos funcionais proteolítico e celulolíticos. Neste último, não diferindo estatisticamente da área de jazida. Isso pode ser devido ao fato de que as áreas de mata constituem-se em um ambiente mais equilibrado, com melhores condições de desenvolvimento e permanência desse tipo de microrganismos, durante o período do ano em que a pluviosidade média é bastante elevada. Zhang et al (2006), atribuíram a maior atividade enzimática de celulolíticos em áreas de floresta, à melhor qualidade da matéria orgânica, o que promove maior diversidade e densidade de microrganismos no período chuvoso. A atividade enzimática da amilase foi maior nas áreas de jazidas, novamente pode-se constatar que o tipo de material vegetal encontrado nessas áreas, que apesar de ter sofrido o maior impacto, pode ter favorecido esse grupo funcional de rizobactérias. No que se refere a esse grupo, ocorre uma recuperação rápida dos microrganismos pertencentes a esse nicho ecológico, sendo, similar a área de mata, que é considerada um ecossistema em equilíbrio. Matsumoto et al. (2005) avaliando grupos funcionais em rizosfera de espécies arbóreas, em diferentes estádios seccionais, verificaram que os microrganismos amilolíticos não sofreram alterações nos diferentes sistemas florestais estudados.

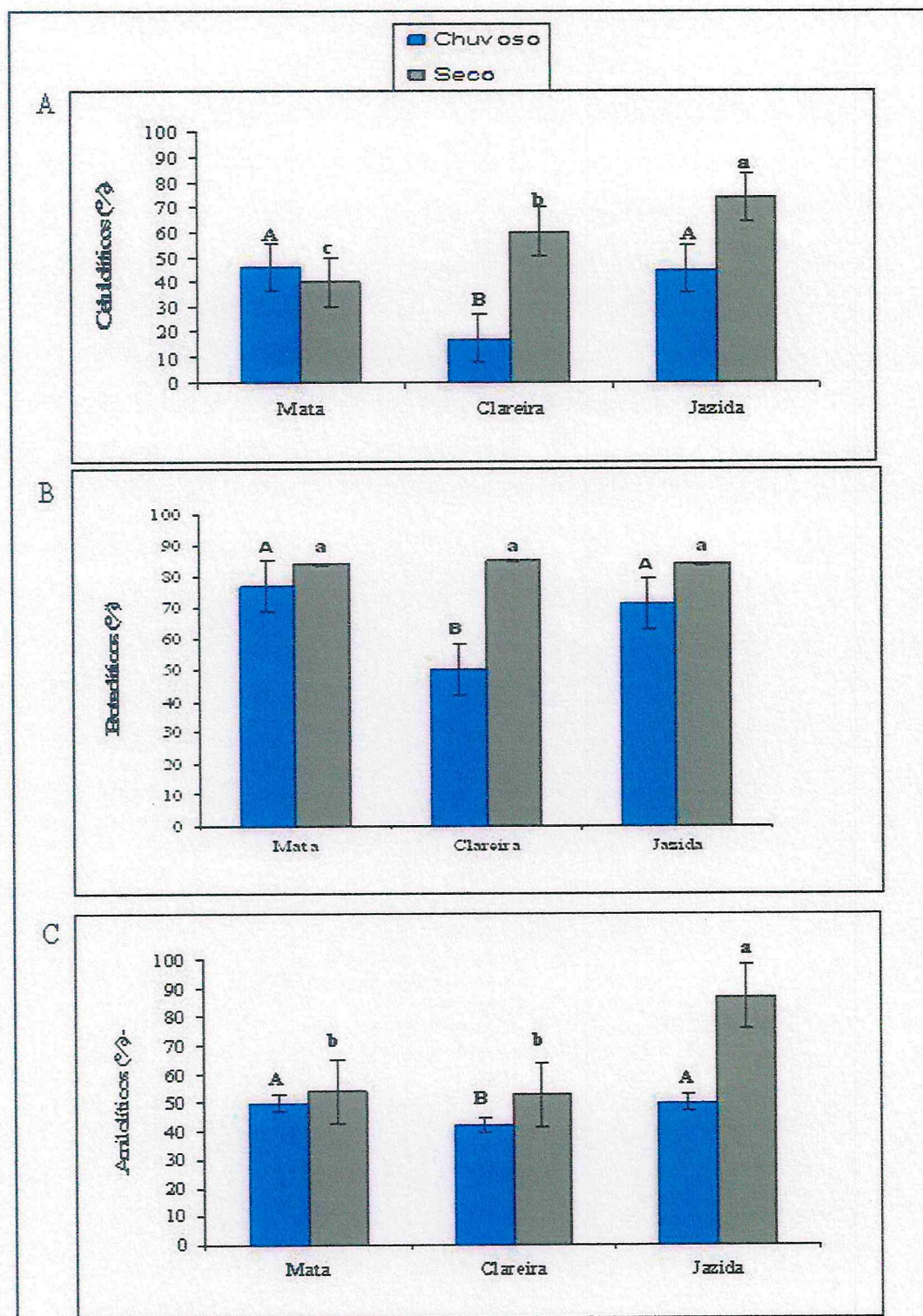


Figura 5 - Rizobactérias (%) Celulolíticas (A), proteolíticas (B) e Amilolíticas (C) associadas a *Bellucia grossularioides*, proveniente de 14 áreas da floresta Amazônica durante os períodos chuvoso e seco, na Base Petrolífera de Urucu, Coari/AM, 2008. Médias seguidas de mesma letra maiúsculas não diferem entre si no período chuvoso e medias seguidas de mesmas letras minúsculas não diferem entre si no período seco, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. As barras do intervalo de confiança diferem os dois períodos numa mesma área.

De modo geral, a população das rizobactérias nas áreas alteradas, jazidas e clareiras, foram influenciadas pelas condições ambientais e precipitação pluviométrica. O microclima nas áreas impactadas, com menor cobertura vegetal e biomassa, são altamente influenciado pela intensidade pluviométrica e temperatura, no qual ocorre, a maior variação do período seco para o chuvoso. Enquanto que, nas áreas de mata foi observado que rizobactérias, dentro de cada grupo funcional, mantiveram uma certa estabilidade considerando os dois períodos, seco e chuvoso. Mostrando que, no ambiente de mata as modificações provocadas pela pluviosidade e temperatura são menos drásticas, devido menor impacto da chuva sobre a microbiota do solo que é protegido pelo dossel fechado existente na área de mata, não sofrendo portanto, com o processo de lavagem do solo.

Foi constatado que não há uma correlação entre aos parâmetros microbiológicos respiração basal (RB) e biomassa microbiana (CBM) e $q\text{CO}_2$ com a atividade de rizobactérias do ciclo do carbono, onde os melhores resultados foram encontrados nas áreas em recuperação. Já nos parâmetros microbiológicos, foram encontrados os maiores valores nas áreas de mata para RB e CBM. Esses resultados, podem estar relacionados, ao método usado para determinar a biomassa que não distingue os tipos de microrganismos que participam desse ciclo no solo, sendo estimado o carbono da biomassa de todos os microrganismos existentes no solo de rizosfera analisada. Esses resultados distintos devem se ao método de isolamento de bactérias do solo. De acordo com Amman et al, (1995); Moreira e Siqueira, (2006). somente 1% das bactérias do solo podem ser isoladas e cultivadas em meio de cultura. sendo que se estima que existam 10.000 espécies de bactérias em 100g de solo (TORSVIK; OVREAS, 1994), portanto sendo deixado de se isolar uma grande quantidade dessas espécies através dos métodos atuais que existem. Estudos moleculares tem ajudado a se obter um estimativa mais precisa de bactérias do solo. Roesch et al., (2007) através de sequências de gene 16 S rRNA encontrou aproximadamente 52.000 unidades taxonômicas diferentes. A grande riqueza no solo de rizobactérias se constituem um empecilho para a avaliação mais precisa da diversidade (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006)

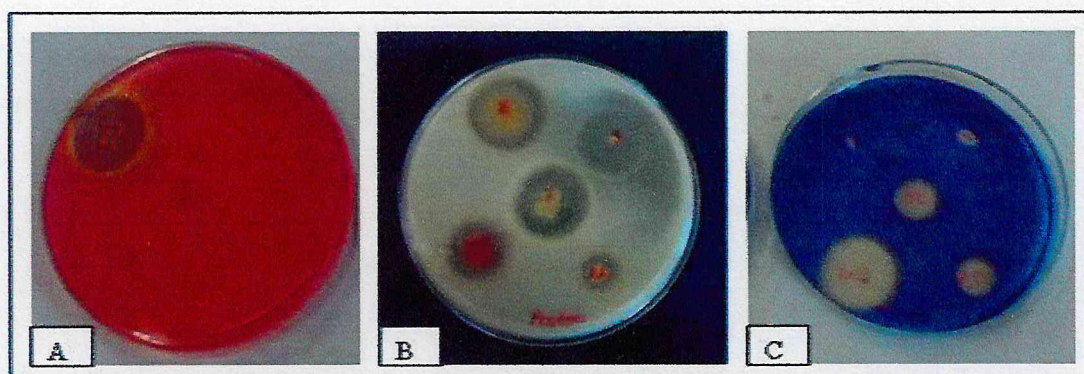


Figura 6 - Rizobactérias produtoras de celulase (A), Protease (B) e Amilase (C) *in vitro* isoladas da rizosfera de *B. grossularioides*, 2008.

4.3.3 Solubilizadoras de fosfato e fosfatase ácida

Na área de mata, independente do período de coleta, foi obtida a maior atividade da enzima fosfatase ácida, acima de $190 \mu\text{g/g}^{-1}$ de solo. Nas áreas alteradas de clareira e jazida, a atividade da fosfatase foi significativamente menor, não diferindo entre períodos e áreas (Tabela 3). Isso indica que, na área de mata existe uma quantidade maior de microrganismos com capacidade de solubilizar fosfato, em comparação com as áreas alteradas, contudo esse parâmetro mensura todos os grupos de microrganismos (fungos e bactérias) existentes no solo, podendo não ser igual à atividade existente nas áreas quando mensurados apenas grupos específicos e capazes de serem isolados e cultivados em meio de cultura. Conte (2002) verificou que a atividade da fosfatase ácida em solos de mata nativa foi 2,5 vezes maior do que a de solo sob cultivo agrícola, demonstrando a sua importância no fornecimento de P para as plantas em sistemas naturais. Efeito similar foi observado nesse estudo onde a mata apresentou maior valor de fosfatase, sendo duas vezes superior no período chuvoso e três vezes maior no período seco, em comparação as áreas reflorestadas.

Tabela 4 - Atividade da enzima fosfatase ácida em $\mu\text{g/g}^{-1}$ de solo na rizosfera de espécie *Bellucia grossularioides* na camada 0-10cm, em área de mata nativa, clareira e jazidas, nos períodos seco e chuvoso, na Base petrolífera de Urucu, Coari/AM, em 2008.

Área	Fosfatase Ácida	Fosfatase Ácida
	Período chuvoso	Período seco
Mata	192,97 aA*	193,71 aA
Clareira	120,01 bA	82,44 bB
Jazida	84,71 bA	61,12 bB

*Médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e letras maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tarafdar e Jungk (1987) mostraram que o aumento da atividade da fosfatase ácida corresponde ao aumento da comunidade de microrganismos na rizosfera de várias plantas. A produção desse tipo de enzimas por microrganismos é responsável pela mineralização do P orgânico (DICK; TABATABAI, 1993). Os microrganismos e as plantas são responsáveis pela produção das fosfatase ácida (TABATABAI, 1994). No entanto, os fungos e bactérias, são as fontes mais expressivas de fosfatase ácida no solo, por causa da sua grande biomassa, alta atividade metabólica e curta tempo de vida, com várias gerações por ano, permitindo a produção e a liberação de quantidades elevadas de enzimas extracelulares em comparação com as plantas.

A porcentagem de rizobactérias solubilizadoras (Figura 8) de fosfato foi maior nas áreas de jazida e clareira, no período seco, com respectivamente 41% e 38%. No período chuvosas, ambas as áreas de jazida e mata, apresentaram 19% de solubilizadoras de fosfato (Figura 7).

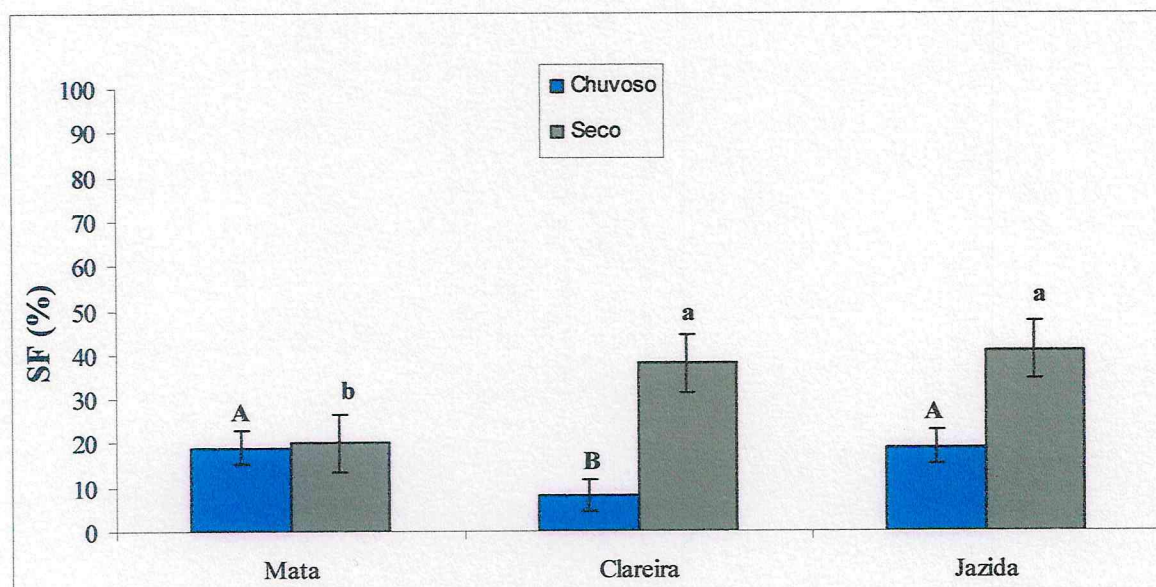


Figura 7 - Rizobactérias solubilizadoras de fosfato (%) associadas a *Bellucia grossularioides*, proveniente de 14 áreas da floresta Amazônica durante os períodos chuvoso e seco, na Base Petrolífera de Urucu, Coari/AM, 2008. Médias seguidas de mesma letra maiúsculas não diferem entre si no período chuvoso e medias seguidas de mesmas letras minúsculas não diferem entre si no período seco, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. As barras do intervalo de confiança diferem os dois períodos numa mesma área.

Os resultados diferem dos verificados para fosfatase ácida que foi maior na área de mata, em ambos os períodos avaliados. Provavelmente, a maior porcentagem na área de mata ocorreu devido à atividade de fosfatase ácida não distinguir os microrganismos, sendo um parâmetro mais geral da atividade de solubilização de fosfato no solo, enquanto que a quantificação das rizobactérias solubilizadoras de fosfato é mais específica para bactérias passíveis de serem isoladas e cultivadas pertencentes a esse nicho ecológico do solo.

Isso determina que as áreas com maior equilíbrio sejam mais importantes para a atividade da fosfatase ácida no solo (MAIA, 2003), embora não signifique que determinados grupos que desempenham essa função acompanham essa tendência, sendo encontrados em áreas com cobertura vegetal que favoreça seu estabelecimento. Os resultados demonstram que a maior atividade de fosfatase ácida se dá ao maior número de microrganismos envolvidos no processo, enquanto que o isolamento possui maiores limitações de método. Isso por que somente 1% das bactérias podem ser cultivadas em meio de cultura e os fungos também possuem papel determinante sobre o ciclo do P no solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Portanto, nesse estudo não há uma correlação entre a fosfatase ácida com a porcentagem de rizobactérias solubilizadoras de fosfato, pois existem outros microrganismos que interferem na fosfatase ácida do solo com destaque para determinados grupos de fungos.

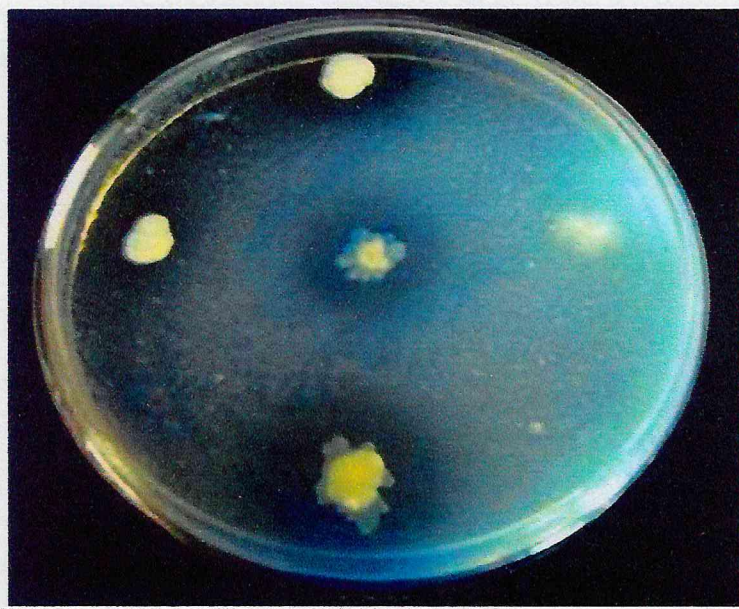


Figura 8 - Solubilização de fosfato in vitro por rizobactérias isoladas da rizosfera de *B. grossularioides*, 2008.

4.3.4 Diversidade bioquímica associada à promoção do crescimento (Produção de AIA, Sideróforos, Giberelinas e Citocininas)

Os resultados dos testes bioquímicos associados à promoção do crescimento (**Figura 9**) mostraram que as áreas das matas e das clareiras, apresentaram maior porcentagem de rizobactérias produtoras de AIA, sideróforos, giberelinas e citocininas; parâmetros estes avaliados nesse estudo. Também foi verificado que não houve diferença estatística na comparação do período seco com o chuvoso dentro de uma mesma área, demonstrando assim que o período não tem grande influência na porcentagem dessas rizobactérias, mas sim, as características das áreas influenciam nessa porcentagem encontrada.

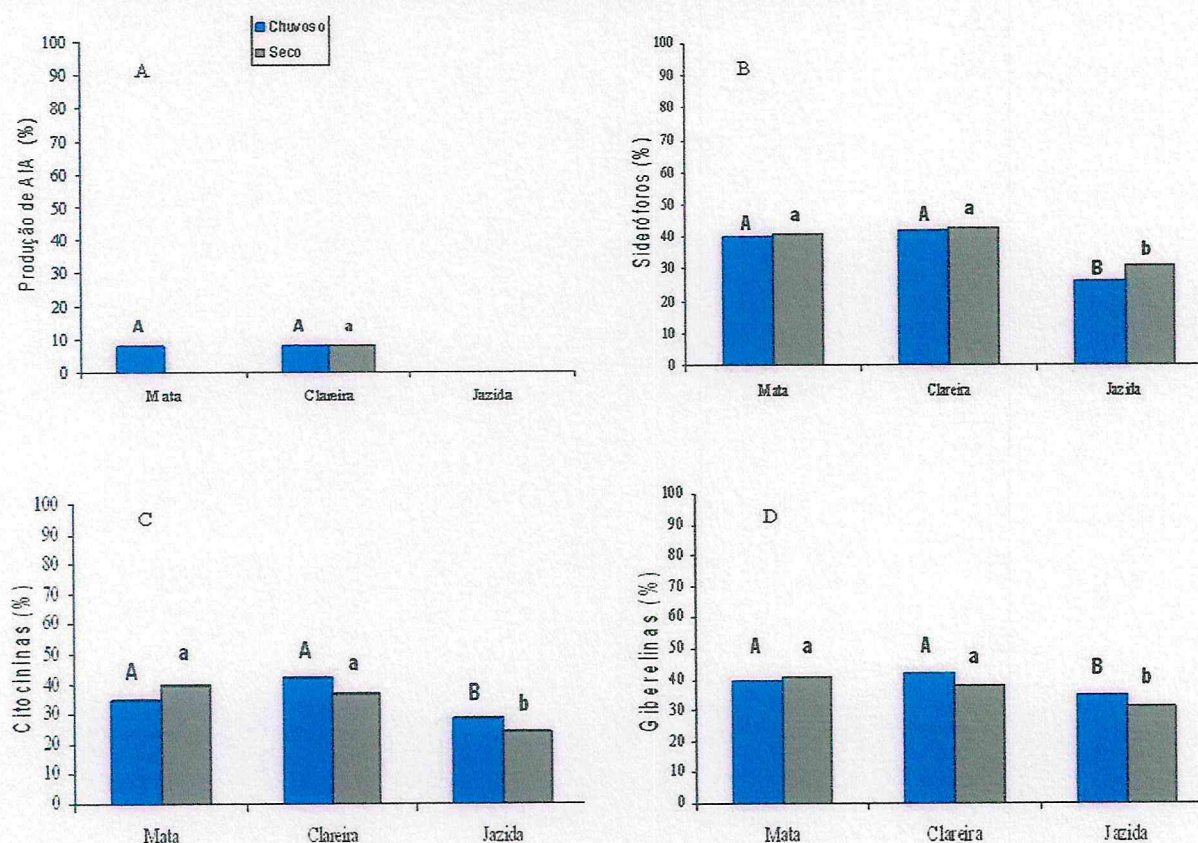


Figura 9 - Rizobactérias (%) produtoras de ácido-indol-acético AIA (A), Sideróforos (B), Citocininas (C) e Giberelinas (D) e associadas à *Bellucia grossularioides*, proveniente de 14 áreas da floresta Amazônica durante os períodos chuvoso e seco, na Base Petrolífera de Urucu, Coari/AM, 2008. Médias seguidas de mesma letra maiúsculas não diferem entre si no período chuvoso e médias seguidas de mesmas letras minúsculas não diferem entre si no período seco, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Os resultados obtidos neste ensaio para a produção de AIA (**Figura 9-A**) foram modestos, apenas 8% das rizobactérias isoladas foram produtoras desse hormônio, nas áreas

de mata e clareira (**Figura 10-A**). As áreas de mata, no período seco, e de jazida, em ambos os períodos, não apresentaram nenhum isolado produtor de AIA, os resultados quando comparados com outros trabalhos encontrados, no qual se verificou a utilização de rizobactérias na produção deste hormônio deixou evidente essa baixa existência de produtores desse hormônio nessa área. Todos apresentavam elevada porcentagem de bactérias produtoras de AIA, como no trabalho de Bernardes (2006), que obteve 40,8% de isolados produtores e do trabalho de Silva (2007) que apresentavam 80,9% dos isolados capazes de produzir AIA. Os resultados discutidos nesse trabalho demonstram que as áreas do presente estudo, apresentam naturalmente baixo índice de bactérias produtoras de AIA.

Com relação a produção de sideróforos (**Figura 10-B**) foram obtidos 41% e 40% de rizobactérias no período seco e de 40% e 42% no chuvoso, respectivamente para mata e clareira, onde os melhores resultados de produção de sideróforos encontrados nessa duas áreas (**Figura 9-B**).

Ambrosine et al. (2007) e Rau et al. (2009) em seus estudos em áreas reflorestadas apresentaram, respectivamente, 87% e 96 % dos isolados produtores de sideróforos, sendo superior aos resultados obtidos neste estudo. Contudo, Antoun et al. (1998) trabalhando com um número semelhante de isolados também encontrou resultados que corroboram com este estudo encontrando 58% das rizobactérias capazes de produzirem sideróforos. Por outro lado, Vargas, (2009) em estudos de diversidade no sul do Brasil encontrou apenas 8% de isolados produtores de sideróforos. Concluindo que a porcentagem de produtores de sideróforos é dependente da área.

A avaliação de rizobactérias produtoras de giberelinas e citocininas (**Figura 10-C**) foi verificado que para as áreas de mata e clareira, a produção de giberelinas foi de respectivamente 40% e 42% de isolados produtores desse hormônio no período chuvoso (**Figura 9-D**). Já no período seco, foram verificados 41% e 38% de rizobactérias produtoras. Os resultados da produção de citocininas (**Figura 9-C**) demonstraram que na área de mata no período chuvoso 35% apresentaram resultado positivo e no período seco 42%. Nas áreas de clareira apresentaram 40% e 37%, respectivamente, para os períodos chuvoso e seco.

Barea et al. (1976) citado por Azeem et al. (2006) relataram que entre 50 bactérias isoladas da rizosfera de diversas plantas, 58% produziram giberelinas e 90% citocininas. Da mesma forma verificou Mansour et al. (1994) testando 24 isolados pertencentes ao gênero *Streptomyces*.

Porcentagens diferentes de rizobactérias produtoras de citocininas também foram confirmados por Garcia de Salamone et al. (2001). Eles relataram que cinco linhagens de PGPR produtoras de citocininas na qual *Pseudomonas fluorescens* apresentaram resultados superiores em relação a os outros isolados. Os resultados que favoreceram essas rizobactérias nas áreas que apresentaram maior percentual, mata e clareira, estão associados ao maior equilíbrio existente na área de mata que favorece esse tipo de microorganismo, de mesmo modo, deve ocorrer com as áreas de clareira, demonstrando que a clareira já esta com um nível de recuperação da área da área que favorece esse tipo de rizobactérias, assemelhando-se as áreas de mata. Os resultados indicam que apesar da área de jazida ter maior idade em recuperação (11 anos) quando comparado a clareira (4 anos), estas áreas de jazida apresentam resultados inferiores, isto demonstra que a área de jazida que foi a área que mais sofreu com processo antrópico, apesar do maior período de recuperação ainda não conseguiu um equilíbrio que se assemelhe a área de clareira que também sofreu com o processo antrópico, porém com menor impacto e menor intensidade, este processo mais lento de recuperação das jazidas deve se a esse processo de exploração mais intenso sofrido na área .

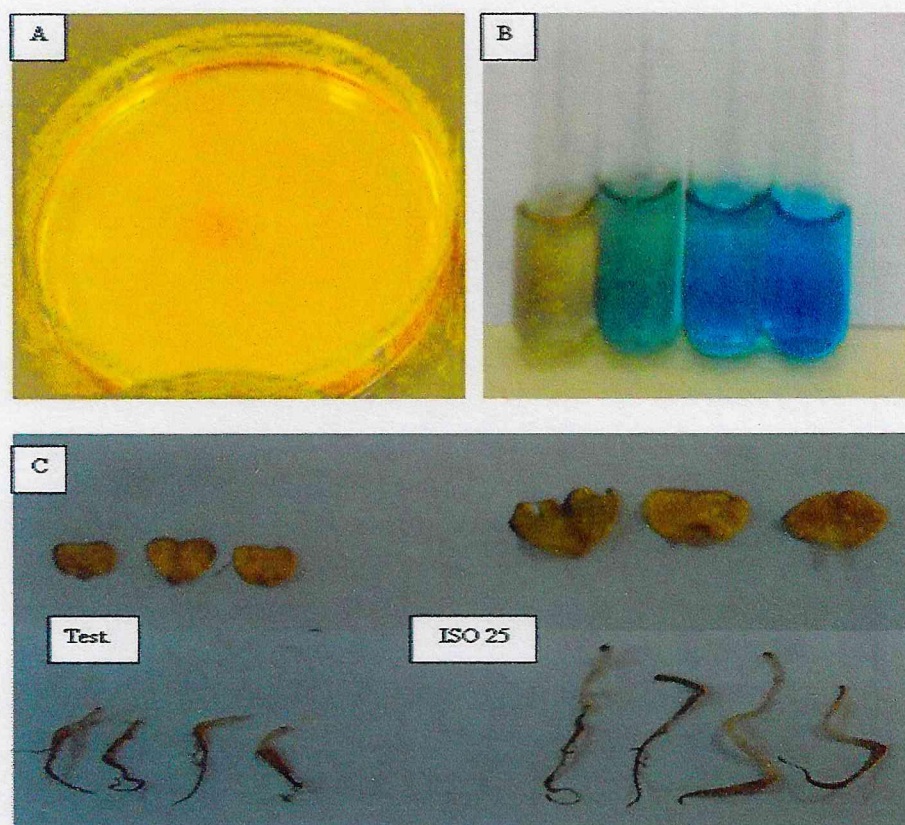


Figura 10 - Produção de AIA (A), Produção de sideróforos (B), Produção de citocininas e giberelinas (C). in vitro por rizobactérias isoladas da rizosfera de *B. grossularioides*, 2008.

4.4. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

A partir das características fenotípicas (**Tabela 5**) dos 118 rizobactérias isoladas, os mesmos foram separados em quarenta e três grupos com características semelhantes (grupos com 100% de similaridade) e, a partir disto, foi gerado um dendograma para verificar a porcentagem de similaridade entre esses grupos formados (**Figura 11**).

Esse agrupamento revela que existem grupos distintos por área e por época do ano. Ou seja, dentro dos 43 grupos formados existem isolados pertencentes às três áreas em estudo, sendo que mais de 70% desses grupos possuem isolados de áreas diferentes.

Os grupos que mais apresentaram isolados pertencentes as três áreas foram 05, 25, 28, 29 e 37, com cerca de 30% dos isolados.

A partir da caracterização dos isolados foi calculado o índice de diversidade de shannon para verificar qual das áreas apresenta maior diversidade de rizobactérias (**Tabela 4**).

Os resultados do índice de Shannon demonstram que a maior diversidade fenotípica ocorreu na área de mata, quando comparadas às áreas reflorestadas, reafirmando que a mata possui maior diversidade de rizobactérias, pois apresenta um ambiente mais equilibrado, abrigando assim maior quantidade de microrganismos diversos. Esses resultados são condizentes com os de densidade e carbono da biomassa microbiana neste estudo, no qual também apresentaram maiores valores na área de mata.

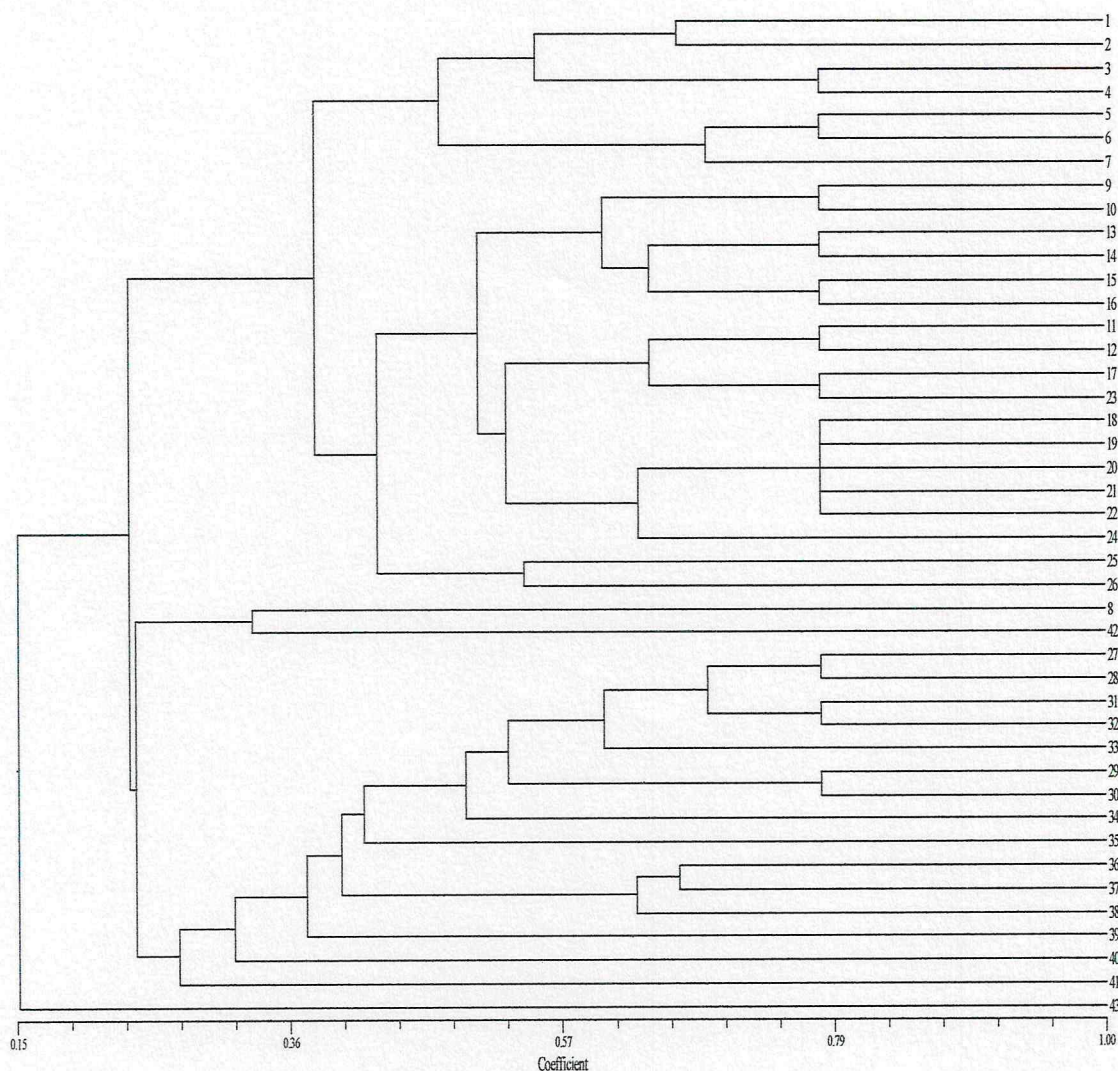


Figura 11 – Dendrograma da diversidade fenotípica de rizobactérias associadas à espécie goiaba de anta (*Bellucia grossularioides*), das diferentes áreas da Base petrolífera de Urucu, Coari/AM, durante os períodos chuvoso e seco. Formados a partir de 43 grupos fenotípicos.

Tabela 5 - Índice de diversidade de Shannon, a partir dos 43 grupos de rizobactérias encontrados em associação com *Bellucia grossularioides* nas áreas de mata e reflorestadas da, Base petrolífera de Urucu, Coari,AM, 2008.

Área	Período chuvoso	Período seco
Mata	0,537	0,512
Ciaraeira	0,270	0,295
Jazida	0,434	0,403

Tabela 6 - Caracterização fenotípica de rizobactérias associadas a espécie *Bellicia grossularioides* em diferentes áreas mata jazida e clareira, da Base petrolífera de Urucu, Coari/AM, durante os períodos chuvoso e seco, 2008.

de Oribius, Comprising Summary of Characters and Isolates																								
Grupos fenotípicos	Gram		Crescimento		Cor						Forma Superfície		Borda			Consistência			Elevação			Nº de Isolados		
	1	2	1	2	1	2	3	4	5	6	1	2	1	2	3	1	2	3	4	1	2		3	
1	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	2	
2	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	1	
3	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	3	
4	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	2	
5	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	8	
6	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	3	
7	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	2	
8	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	1	
9	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	4	
10	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	3	
11	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	2	
12	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	1	
13	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	1	
14	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	1	
15	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	1	
16	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	1	
17	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	1	
18	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	2	
19	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	2	
20	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	4	
21	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	1	
22	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	1	
23	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	5	

Avaliações: Gram (1-positivo, 2-negativo); Tempo de Crescimento (1-24 horas, 2-48 horas); Cor da borda (1-branco, 2-creme, 3-creme escuro, 4-amarelo, 5-vermelho, 6-rosa); Forma da colônia (1-circular, 2-irregular); Superfície da colônia (1-lisa, 2-rugosa); Borda (1-inteira, 2-lobada, 3-erosada); Consistência (1-viscosa, 2-seca, 3-aquosa, 4-gomosa); Elevação (1-elevada, 2-achatada, 3-convexa).

Tabela 6 Cont.. Caracterização fenotípica de rizobactérias associadas a espécie *Bellicia grossularioides* em diferentes áreas mata jazida e clareira, da Base petrolífera de Urucu, Coari/AM, durante os períodos chuvoso e seco, 2008.

Grupos fenotípicos	Gram		Crescimento		Cor						Forma		Superfície		Borda			Consistência				Elevação			Nº de Isolados
	1	2	1	2	1	2	3	4	5	6	1	2	1	2	1	2	3	1	2	3	4	1	2	3	
24	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	1
25	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	18
26	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	1
27	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	2
28	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	7
29	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	10
30	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	1
31	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	2
32	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	2
33	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	1
34	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	2
35	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	1
36	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	1
37	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	9
38	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	3
39	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	1
40	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	1
41	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	2
42	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	3
43	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1

Avaliações: Gram (1-positivo, 2-negativo); Tempo de Crescimento (1-24 horas, 2-48 horas); Cor da borda (1-branco, 2-creme, 3-creme escuro, 4-amarelo, 5-vermelho, 6-rosa); Forma da colônia (1-circular, 2-irregular); Superfície da colônia (1-lisa, 2- rugosa); Borda (1-inteira, 2-lobada, 3-erosada); Consistência (1-viscosa, 2-seca, 3-aquosa, 4-gomosa); Elevação (1-elevada, 2-achatada, 3-convexa).

5 CONCLUSÕES

- As variáveis de nível populacional UFC, atributos microbiológicos e Índice de Shannon das áreas mostraram que a mata nativa possui maior densidade e diversidade de rizobactérias associadas à *Bellucia grossulariodes*, em ambos os períodos do ano;
- Os microrganismos do ciclo do carbono estão mais presentes nas áreas de recuperação durante o período seco. Já no período chuvoso estão mais presentes na área de mata;
- A fixação de nitrogênio foi maior nos dois períodos de coleta, nas áreas de clareira;
- A atividade da fosfatase ácida foi maior na área de mata, em contra partida, as rizobactérias solubilizadoras de fosfato ocorreram em maior densidade nas áreas de jazida e clareira no período seco e nas áreas de mata e jazida no período chuvoso;
- Foram determinados 43 grupos fenotipicamente iguais entre isolados dentro de cada grupo
- Os grupos funcionais de rizobactérias não possuem os isolados pertencentes a uma mesma área.

REFERÊNCIAS

ALEF, K. Soil respiration. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, D. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. London: Academic Press, 1995. p. 214-216.

AMMAN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Washington, v.59, p. 143-169, 1995.

AMBROSINI, A.; GIONGO, A.; BENEDUZI, A.; COBALCHINI, N.; FRIEDRICH, L.; PASSAGLIA, L. M. P. Bactérias promotoras de crescimento vegetal em *Vriesea gigantea* Gaudchi. (Bromeliaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, n.20, supl.2, jul. 2007. p. 1169-1170.

ANDERSON, M; KJOLLER, A; STRUWE, S. Microbial enzyme activities in leaf litter, humus and mineral soil layers of European forests. **Soil Biology and Biochemistry**, v.36, p. 1527-1537, 2004.

ANDERSON, T. H.; DOMSCH, K. H. The metabolic quotient for CO₂ (qCO₂) as a specific activity parameter to assess the effects of environment conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. **Soil Biol. Biochem.**, v.25, p. 393-395, 1993.

ANDRADE, G. Role of functional groups of microorganisms on the rhizosphere. **Plant Surface Microbiology**, p. 51-69, 2004.

ANTOUN, H.; BEAUCHAMP, J.; GOUSSARD, N.; CHABOT, R.; LALANDE, R. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth-promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). **Plant Soil**, v.204, p. 57-67, 1998.

ARAÚJO R. W.; CARMO F. M. S.; FERREIRA F. A. ; LEMOS P. H. D.; SILVA A. F.; FERREIRA-JUNIOR W. G. Interação entre espécies arbóreas em um fragmento florestal: um caso de fitotoxicidade no passado, no presente o no futuro. In: Avanços nos estudos de ecossistemas terrestres, marinhos e de águas continentais. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 7., 2005, Caxambu. **Anais...** Caxambu, 2005.

ARATO, H. D.; MARTINS, S. V.; FERRARI, S. H. S. Produção e decomposição de serrapilheira em um sistema agroflorestal implantado para recuperação de área degradada em Viçosa-MG. **Revista Árvore**, v.27, n.5, p.715-721, 2003.

AZEEM, K.; ARSHAD, M.; KHALID, Z. A. Z. **Biological Approaches to Sustainable Soil Systems**. [S.l.]: [s.n.], 2006.

BADIANE, N. N. Y.; CHOTTE, J. L.; PATE, E.; MASSE, D.; ROULAND, C. Use of soil enzyme activities to monitor soil quality in natural and improved fallows in semi-arid tropical regions. **Applied Soil Ecology**, v.18, p.229-238, 2001.

BAIS, H. P.; WEIR, T. L.; PERRY, L. G.; GILROY, S. The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. **Annu. Rev. Plant Bio**, v.57, p. 233-66, 2006.

BALOTA, E. L.; KANASHIRO, M.; COLOZZI FILHO, A.; ANDRADE, D. S. ; DICK, R. P. Soil enzyme activities under long-term tillage and crop rotation systems in subtropical agro-ecosystems. **Brasilian Journal of Microbiology**, v.35, p.300-306, 2004.

BARBOSA, J. H. C. **Dinâmica da serrapilheira em estágios sucessionais de Floresta Atlântica (Reserva Biológica de Poço das Antas- RJ)**. 2000. 110f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Florestais) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2000.

BARBOSA, L. M. Considerações Gerais e Modelos de Recuperação de Formações Ciliares. In: RODRIGUES, R. R.; LEITÃO FILHO, H. F. **Matas ciliares: conservação e recuperação**. São Paulo: USP/FAPESP, 2003. p. 289-312.

BAREA, J. M.; NAVARRO, E.; MONTROYA, E. Production of plant growth regulators by rhizosphere phosphate-solubilizing bacteria, **J. Appl.Bacteriol.**, v.40, p. 129-134, 1976.

BARETTA, D.; SANTOS, J. C. P.; MANFROI, A. F.; TASCA, F. A.; DOMINGOS, M. O.; KLAUBERG-FILHO, O.; MAFRA, A. L. Diversidade da fauna edáfica em mata nativa, floresta de pinus e campo nativo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 29. 2003. Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: SBCE/UNESP, 2005. p. 1-4.

BARLOWA, J., GARDNER, T. A., FERREIRA, L. V.; PERES, C. A. Litter fall and decomposition in primary, secondary and plantation forests in the Brazilian Amazon. In: **Forest Ecology and Management**, 2007.

BERNARDES, F. S. **Rizobactérias na indução de resistência em cultivos hidropônicos**. 2006. 58 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 2006.

BLUM, R. H. Basic concepts: degradation, resilience and rehabilitation In: LAL, R.; BLUM, W. H.; VALENTINE, C.; STEWART, B. A. **Methods for assessment of soil degradation**. New York: CRC Press, 1998. p. 1-16.

BORGES, J. D.; SILVA, N. F.; XIMENES, P. A.; PINHEIRO, J. B.; CARNEIRO, M. F. SOUZA, E. R. B.; SOARES, R. A. B. Estabelecimento e desenvolvimento de espécies arbóreas em recomposição de matas ciliares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.30, n.5, 2000.

BRIC, J. M.; BOSTOCK, R. M.; SILVERSTONE, S. E. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p. 535-538, 1991.

BROOKES, P. C. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.19, p. 269-279, 1995.

CARDOSO, E. J. B. N.; FREITAS, S. S. A rizosfera. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. (Ed.). Microbiologia do solo. **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, p. 41-57, 1992.

CARNEIRO, R. G.; MENDES, I. C.; LOVATO, P. E.; CARVALHO, A. M.; VIVALDI, L. **Ciência do Solo**. Lages: CAV-UDESC, 2005.

CARPANEZZI, A. A. et al. Espécies pioneiras para recuperação de áreas degradadas: a observação de laboratórios naturais. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 6, Campos do Jordão. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 1990.

CATELLAN, A. J. **Métodos qualitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal**. Londrina: Embrapa Soja, 1999.

CARVALHO, F. **Atributos bioquímicos como indicadores da qualidade de solo em florestas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. no Estado de São Paulo**. 2005. 79 f. Dissertação (Mestrado) - ESALQ, Piracicaba, 2005.

CHANWAY, C. P.; SHISHIDO, M.; NAIRN, J.; JUNGWIRTH, S.; MARKHAM, J.; XIAO, G.; HOLL, F. G. Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. **For. Ecol. Manag.**, v.133, p.81-88, 2000.

CHAIHARN, M.; LUMYONG, S. Phosphate solubilization potential and stress tolerance of rhizobacteria from rice soil in Northern Thailand. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.25, p. 305-314, 2009.

CONTE, A. J. Efeito da fitase e xilanase sobre a energia metabolizável do farelo de arroz integral em frangos de corte. **Cienc. Agrotec.**, Lavras, v.26, n.6, p. 1289-1296, 2002.

D'ANDREA, A. F.; SILVA, M. L. N.; CURI, N.; SIQUEIRA, J. O.; CARNEIRO, M. A. C. Atributos biológicos indicadores da qualidade do solo em sistemas de manejo na região do cerrado no sul do estado de Goiás. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.26, p. 913-923, 2002.

DE LUCA, T.H.; KEENEY, D.R. Soluble anthrone-reactive carbon in soils: effect of carbon and nitrogen amendments. **Soil Science Society of America Journal**, 57, 1296–1300, 1993.

DE-POLLI, H.; GUERRA, J. G. M. C, N e P na biomassa microbiana do solo. In: SANTOS, G. A.; CAMARGO, F. A. O. (Ed.). **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais**. Porto Alegre: Genesis, 1999. p. 389-411.

DIAS, L. E.; GRIFFITH, J. J. Conceituação e Caracterização De Áreas Degradadas. IN: DIAS, L. E.; MELLO, J. W. V. **Recuperação de Áreas Degradadas**. Viçosa: UFV, 1998. p. 1-7.

DIAZ-RAVINA, M.; ACEA, M. J.; CARBALLAS, T. Seasonal changes in microbial biomass and nutrient flush in forest soils. **Biol. Fert. Soils**, v.19, p. 220-226, 1995.

DICK, W. A.; TABATABAI, M. A. Significance and potential uses of soil enzymes. In: METTING JUNIOR, F. B. (Ed.). **Soil microbial ecology applications in agricultural and environmental management**. New York: M. Dekker, 1993. p. 95-127.

DOBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative simbiose in subtropical grasses: characterization of microrganisms and dinitrogens fix-ing sites. In: Newton, W. E.; Nyman, C. J. (Ed.). **Proceedings of the International Symposium on Nitrogen Fixation II**. Pullman: Washington State University Press, 1976. p. 518–538.

DONZELI, V. P. **Atividade e alguns componentes da comunidade microbiana do solo e microrganismos diazotróficos endofíticos sob influência do nitrogênio na cultura do milho**. 2006. 84 f. Dissertação (Mestrado) - UNICAMP, Campinas, 2006.

DOYLE J., PAVEL R., BARNESS G.; STEINBERGER Y. Cellulase dynamics in desert soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.38, n.2, p. 371-376, 2006.

DORAN, J. W.; ZEISS, M. R. Soil health and sustainability: managing the biotic vomponent of soil quality. **Applied Soil Ecology**, v.15, p. 3-11, 2000.

DORAN, J. W.; SARRANTONIO, M.; LIEBIG, M. A. Soil health and sustainability. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 56, p. 2-54, 1996.

FASSBENDER, H. W. Ciclos da matéria orgânica e dos nutrientes em ecossistemas florestais dos trópicos. In: CABALA-ROSAND, P. (Ed.). **Reciclagem de nutrientes e agricultura de baixos insumos nos trópicos**. Ilhéus: CEPLAC, 1985. p. 203-230.

FERRAZ, J.; BARBOSA, E.; PEREIRA, E. **Monitoramento dos reflorestamentos da Mineração Rio do Norte S. A.** Porto Trombetas – PA: [s.n.], 1998. (Relatório Técnico).

FREITAS, S. S.; AGUILAR-VILDOSO, C. I. Rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.28, p. 987-994, 2004.

FREITAS, S. S.; PIZZINATTO, M. A. Ação de rizobactérias sobre a incidência de *Colletotrichum gossypii* e promoção de crescimento em plântulas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). **Summa Phytopathologica**, v. 23, p. 36-41, 1997.

GARCIA DE SALAMONE, I. E.; HYNES, R. K.; NELSON, L. M. Cytokinin production by plant growth Promoting rhizobacteria and selected mutants . **Can. J. Microbiol.**, v.47; p. 404-411, 2001.

GARRIDO, M. A. O. **Caracteres silviculturais e conteúdo de nutrientes no folheto de alguns povoamentos puros e mistos de espécies nativas**. 1981. 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Piracicaba: ESALQ, 1981.

GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.41, p. 109-117, 1995.

GONÇALVES, J. F. C.; VIEIRA, G.; MARENCO, R. A.; FERRAZ, J. B. S.; SANTOS JÚNIOR, U. M.; BARROS, F. C. Nutritional status and specific leaf area of mahogany and tonka bean under light environments. **Acta Amazonica**, v.35, n.1, p. 23-27, 2005.

GONÇALVES, J. L. M.; SANTARELLI, E. D.; MORAES NETO, S. P. ; MANARA, M. P. Produção de mudas de espécies nativas: substrato, nutrição, sombreamento e fertilização. In: GONÇALVES, J. L. M.; BENEDETTI, V. (Ed.). **Nutrição e fertilização florestal**. Piracicaba: IPEF, 2000. p. 309-350.

GORDON, S.A.; WEBER, P.R. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, v.26, p.192-195, 1951.

GOODWIN, S. B. The population genetics of *Phytophthora*. **Phytopathology**, v.87, p. 462-473, 1997.

GUEDES, S. F. F. Carbono orgânico e atributos químicos do solo incorporation. **Soil Biology and Biochemistry**. Oxford, v.19, p. 159-164, 1987.

GUEDES, M. C. **Ciclagem de nutrientes após aplicação de lodo de esgoto (biossólido) sobre Latossolo cultivado com *Eucalyptus grandis***. 2005. 154 f. Tese (Doutorado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2005.

HARIPRASAD, P.; NIRANJANA, S. R. Isolation and characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria to improve plant health of tomato. **Plant Soil**, v. 316, p. 13-24, 2009.

HERRERA, R. Nutrient cycling in Amazonian Forests. In: PRANCE, G. T.; LOVEJOY, T. E. (Ed.). **Amazonia: key environments**. Oxford : Pergamon Press, 1985. p. 95-105.

INSAM, H.; DOMSCH, K. H. Relationship between soil organic carbon and microbial biomass on chronosequences of reclamation sites. **Microbiol. Ecol.**, v.15, p.177-188, 1988.

IZQUIERDO, I.; CARAVACA, F. C.; ALGUACIL, M. M.; HERNÁNDEZ, G.; ROLDÁN. Indicadores biológicos associados ao ciclo do fósforo em solos de Cerrado sob plantio direto e plantio convencional. **Pesquisa Agropecuária Brasileira Brasília**, v.39, n.7, p.661-669, 2005.

JENKINSON, D. S.; LADD, J. N. Microbial biomass in soil: Measurement and turnover. In: PAUL, E. A.; LADD, J. M. (Ed.). **Soil Biochem.** v.5, p. 415-471, 1981.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p. 969-979, 1970.

KAMILOVA, F.; KRAVCHENKO, L. V.; SHAPOSHNIKOV, A. I.; AZAROVA, T.; AKAROVA, N.; LUGTENBERG, B. Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. **Molecular plant microbe interactions**, Saint Paul, v.19, n.2, p. 250-256, 2006.

KARLEN, D. L.; DITZLER, C. A.; ANDREWS, S. S. Soil quality: why and how? **Geoderma**, Amsterdam, v. 114, n.3/4, p. 145-156, 2003.

KENNEDY, A. C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.74, p. 65-76, 1999.

KLOEPPER, J. W. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. In: **Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management**. New York: FBJ meeting, 1993. p. 255-274.

KLEMENT, Z., RUDOLPH, K.; SANDS, D. C. Methods in Phytobacteriology. In: **Akadémiai Kiadó**, Budapest, 1990. 568 p.

KUREK, E.; JAROSZUK-SCISEL, J. Rye (*Secale cereale*) growth promotion by *Pseudomonas fluorescens* strains and their interactions with *Fusarium culmorum* under various soil conditions. **Biological Control**, 2002.

LEAL FILHO, N.; ALENCAR, R. M.; LEME, R.; GRIBEL, R.; MELO NETO, A. G. Efeito da cobertura com resíduos vegetais sobre o desenvolvimento de plantios em áreas degradadas na região de urucu, Am. In: V SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS: água e biodiversidade, 2003.

LEAL FILHO, N.; LEME, R.; RODRIGUES, D. S.; BARROS, E.; COUTO, L. B.; GRIBEL, R. Efeito da cobertura de matéria orgânica sobre o estabelecimento e desenvolvimento de espécies originadas do banco de sementes em áreas em recuperação na floresta amazônica brasileira. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS: Água e Biodiversidade, 5, 2002, Minas Gerais. **Anais...** Belo Horizonte, 2002.

LETHAM, D. S. Regulators of cell division in plant tissues XII. A cytokinin bioassay using excised radish cotyledons. **Physiologia Plantarum**, v.25, p.391-96, 1971.

LOVEJOY, T. E.; BIERREGAARD, R. O. Central Amazonian forest fragments and the minimum critical size of ecosystems project. In: Gentry, A. H. (Ed.). **Four Neotropical Rainforests**. New Haven: Yale University Press, 1990. p. 60-71.

MÄDER, P.; FLIEBACH, A.; DUBOIS, D.; GUNST, L.; FRIED, P.; NIGGLI, U. Soil fertility and biodiversity in organic farming. **Science**, London, v. 296, p. 1694-1697, 2002.

MAIA, F. C., MORAES, D. M., MORAES, R. C. P. Atividade total da fosfatase ácida e da amilase induzidas por ácido jasmônico em sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.22, n.1, p. 259-263, 2003.

MAGALHÃES, L. M. S.; FERNANDES, N. P.; ALENCAR, J. C. Sistemas de regeneração artificial com essências florestais nativas na Amazônia. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE ECOLOGIA, 2, 1980, Belém. **Anais...** Belém: Secretaria de Agricultura do Estado do Pará, 1980. p. 169-183.

MARIANO, R. L. R.; KLOEPPER, J. W. Método alternativo de biocontrole: resistência sistêmica induzida por rizobactérias, **RAPP**, v.8, p. 121-137, 2000.

MARUMATTO, T.; ANDERSON, J. P. E.; DOMSCH, K. H. Mineralization of nutrients from soil microbial biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.14, p. 469-475, 1982.

MANSOUR, F. A.; ILDESUGUY, H. S.; ANDHAMEDO, H. A. Studies on plant growth regulators and enzyme Production by some bacteria. **Qatar Univ. Sci**, v.14, p. 281-288, 1994.

MATSUMOTO, L. S.; MARTINES, A. M.; AVANZI, M. A.; ALBINO, U. B.; BRASIL, C. B.; SARIDAKIS, D. P.; RAMPAZO, L. G. L.; ZANGARO, W.; ANDRADE, G. Interactions among functional groups in the cycling of carbon, nitrogen and phosphorus in the rhizosphere of three successional species of tropical woody trees. **Applied Soil Ecology**, v.28, p. 57-65, 2005.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Microbiologia ambiental**. Jaguariúna: Embrapa, 1997.

MIYAUCHI, Marina Yumi Horta. **Propriedades Microbiológicas e Bioquímicas do Ciclo Do Carbono em Solo Sob Diferentes Coberturas Vegetais**. Dissertação (Mestrado) - UEL, Londrina, 2007.

MOREIRA, A; COSTA, D. G. Dinâmica da matéria orgânica na recuperação de clareiras da floresta amazônica. **Pesq. agropec. Brás**, Brasília - DF, v.39, n.10, 2007.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2.ed. atual. ampl. Lavras: Ufla, 2006. 729p.

NEHL, D. B.; ALLEM, S. J.; BROWN, J. F. Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. **Applied Soil Ecology**, v.5, p. 1-20, 1996.

NAYAK, A.; BABU, Y. J.; ADHYA, T. K. Long-term application of compost influences microbial biomass and enzyme activities in a tropical aeric endoaquept planted to rice under flooded condition. **Soil Biology and Biochemistry**, v.39, p. 1897-1906, 2007.

PATRÍCIO, F. R. A.; ALMEIDA, I. M. G.; SANTOS, A. S.; CABRAL, O.; TESSARIOLI NETO, J.; SINIGAGLIA, C.; BERIAM, L. O. S.; RODRIGUES NETO, J. Avaliação da solarização do solo para o controle de *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.475-481, 2005.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p. 3795-3801, 2002.

PAUL, K. I. Change in soil carbon following afforestation. **Forest Ecology and Management**, v.168, p. 241-257, 2002.

PERRY, D. A.; AMARANTHUS, M. P.; BORCHERS, J. G.; BORCHERS, S. L.; BRAINERD, R. E. Bootstrapping in ecosystems. **BioScience**, v.39, n.4, p. 230-237, 2004.

PFLEGER, F. L.; STEWART, E. L.; NOYD, R. K. Role of VAM fungi in mine land revegetation. In: PFLEGER, F. L.; LINGERMAN, R. G. **Micorrizae and plant health**. St Paul: APS Press, 1994. p.47-82.

PASCUAL, J. A.; GARCIA, C.; HERNADEZ, T.; MORENO, J. L.; ROS, M. Soil microbial activity as a biomarker of degradation and remediation processes. **Soil Biol. Biochem**, v.32, p. 1877-1883, 2000.

POWLSON, D. S.; BROOKES, P. C.; CHRISTENSEN, B. T. Measurement of soil microbial. **R. Bras. Ci. Solo**, v.26, p. 913-923, 2002.

RAU, N.; MISHRA, V.; SHARMA, M.; MRINAL, K.; AHALUWALIA, K.; RADHEY S. S. Evaluation of functional diversity in rhizobacterial taxa of a wild grass (*Saccharum ravennae*) colonizing abandoned fly ash dumps in Delhi urban Ecosystem. **Soil Biology & Biochemistry**, v.41, p. 813-821, 2009.

RODRIGUES, R. R.; GANDOLFI, S. Restauração de florestas tropicais: subsídios para uma definição metodológica e indicadores de avaliação e monitoramento. In: DIAS, L. E.; MELLO, J. W. (Ed.). **Recuperação de áreas degradadas**. Viçosa: UFV / SOBRADE, 1998. p.203-215.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v.17, p. 319-339, 1999.

ROESCH, L. F.; CAMARGO, F. O.; SELBACH, P. A.; SÁ, E. S. Reinoculação de bactérias diazotróficas aumentando o crescimento de plantas de trigo. **Ci. Rural**, v.35, p.1201-1204, 2005.

ROGERS, B. F.; TATE III, R. L. Temporal analysis of the soil microbial community along a toposequence in Pineland soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.33, n.10, p. 1389-1401, 2001.

ROMEIRO, R. S. Preservação de bactérias fitopatogênicas. In: Romeiro, R.S. (Ed.) **Métodos em Bacteriologia de Plantas**. Viçosa: UFV, 2001. p. 87-96.

RUTIGLIANO, F. A. Soil microbial metabolism and nutrient status in a Mediterranean área as affected by plant cover. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 1719-1729, 2004.

SALES, T. M.; SILVA, G. B.; LUSTOSA, D. C.; BATISTA, T. F. C. **Diversidade de Bactérias de Solo em Clareiras e Floresta Nativa Provenientes de Áreas de Terra Firme Alteradas Pela Exploração de Petróleo**. [Belém?]: UFRA, 2008.

SALOMÃO, R. P.; ROSA, N. A.; MORAIS, K. A. C. Dinâmica da regeneração natural de árvores em áreas mineradas na Amazônia. **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi**, Belém, v.2, n.2, p. 85-139, mai./ago., 2007. (Ciências Naturais).

SANTARELLI, E. G. Produção de mudas de espécies nativas. In: RODRIGUES, R. R.; LEITÃO FILHO, H. F. (Ed.). **Matas ciliares: conservação e recuperação**. 3.ed. São Paulo: Edusp/ Fapesp, 2004. p. 313-318.

SANTOS Jr., U. M. ; GONÇALVES, F. C.; FELDPAUSCH, T. R. Growth, leaf nutrient concentration and photosynthetic nutrient use efficiency in tropical tree species planted in degraded areas in central Amazonia. **Forest Ecology and Management**, 2006. p. 299-309.

SAVIOZZI, A.; BUFALINO, P.; LEVI-MINZI, R.; RIFFALD, R. Biochemical activities in a degraded soil restored by two amendments: a laboratory study. **Biology & Fertility of Soils**, Berlin, v. 35, p. 96-101, 2002.

SILVA, A. C. M. **Diversidade genética, densidade populacional e potencial de promoção de crescimento de rizobactérias associadas ao cacaueiro**. 2007. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Cruz das Almas, Bahia, 2007.

SILVA, Carlos E. M. et al. Nutrient use efficiency for pioneer species grown on abandoned pastures in central Amazonia. *Acta Amazônica*, Manaus, v.36, n.4, Dec., 2006.

SILVEIRA, R. B.; MELLONI, R.; MELLONI, E. G. P. Atributos microbiológicos e bioquímicos como indicadores da recuperação de áreas degradadas, em Itajubá/MG. *Cerne*, Lavras, v.12, n.1, p. 48-55, jan./mar., 2006.

SORREANO, M. C. M. **Avaliação de aspectos da dinâmica de florestas restauradas, com diferentes idades.** Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2002.

SOUZA, I. M. Z. **Carbono e Nitrogênio da Biomassa Microbiana do Solo em Áreas Reflorestadas Comparadas ao Campo e Mata Nativa no Planalto Dos Campos Gerais, SC.** Dissertação (Mestrado em ciências do solo) - UDESC, Lages, 2005.

SPOSITO, G.; ZABEL, A. The assessment of soil quality. *Geoderma*, Amsterdam, v.114, n.3/4, p. 143-144, 2003.

SPACCINI, R.; ZENA, A.; IGWE, C. A.; MBAGWU, J. S. C.; PICCOLO, A. Carbohydrates in water-stable aggregates and particle size fractions of forested and cultivated soils in two contrasting tropical ecosystems. *Biogeochemistry*, v.22, p. 1-22, 2001.

STURZ, A.V.; NOWAK, J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Applied Soil Ecology*, v.15, p. 183-190, 2000.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; AKASAWA, N.; LA TORRANCA, S.; MAGALHÃES, F. M.; OLIVEIRA, L. A.; PEREIRA, R. M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfato na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. *Acta Amazônica*, v.12, p. 15-22, 1982.

TABATABAI, M. A. Soil enzymes. In: WEAVER, R. W.; ANGLE, J. S.; BOTTOMLEY, P. S. *Methods of soil analysis: microbiological and biochemical properties.* **Soil Science Society of America**, Madison, 1994. p. 775-883.

TARAFDAR, J. C.; JUNGK, A. Phosphatase activity in the rhizosphere and its relation to the depletion of soil organic phosphorus. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v.3, p. 199-204, 1987.

- TONINI, H.; VERDE, M. F. A.; SCHWENGBER, D.; MOURÃO, M. Avaliação de Espécies Florestais em Área de Mata no Estado de Roraima. **Revista Cerne**, Lavras, v.12, n.001, jan./mar., 2006.
- TORSVIK, V.; OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdam, v.5, n.3, p. 240–245, 2002.
- VANCE, E. D., BROOKES, P. C., JENKINSON, D. S., 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biol. Biochemyst**, v.19, p.703–707.
- VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; SCHLINDWEIN, G.; GRANADA, C. E.; GIONGO, A.; BENEDUZI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Occurrence of plant growth-promoting traits in clover-nodulating rhizobia strains isolated from different soils in Rio Grande do Sul state. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**, Viçosa, v.33, n.5, Oct., 2009 .
- WANDER, M. M.; TRAINA, B. R. Organic And Conventional Management Effects On Biologically Active Soil Organic Matter Pools. **Soil Science Society of America Journal**, v.58, p. 1130-1139, 1994.
- WARDLE, D. A. A comparative assessment of factors which influence microbial biomass carbon and nitrogen levels in soil. **Biol. Rev.**, v.67, p. 321-358, 1992.
- WOOD, P. J. Specify in the interactions of direct dyes with polysaccharides. **Carbohydr Res.**, v.85, p. 271–287, 1980.
- ZAADY, E.; PEREVOLOTSKY, A.; OKON, Y. Promotion of plant growth by inoculum with aggregated and single cell suspensions of *Azospirillum brasilense* Cd. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 25, p. 819-823, 1993.
- ZAGO, V. C. P.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N. G. **Pseudomonas spp fluorescentes – bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola**. Seropédica: Embrapa agrobiologia, 2000. 32p. (Documentos, 127).
- ZHANG, P.; LI, L.; PAN, G.; REN, J. Soil quality changes in land degradation as indicated by soil chemical, biochemical and microbiological properties in a karst area of southwest Guizhou, China. **Environmental Geology**, v.51, p. 609-619, 2006.