

**DIVERSIDADE BACTERIANA DE SOLOS SOB
DIFERENTES AGROECOSSISTEMAS E ESTÁGIOS
SUCESSIONAIS DE FLORESTA DE MATA
ATLÂNTICA DO RIO DE JANEIRO**

Aboim¹ M.C. R.*, Coutinho² H. L. C., Peixoto¹ R. S., Rosado¹ A. S.;

¹IMPPG-UFRJ; ²Embrapa Solos

* aboim@imagelink.com.br

INTRODUÇÃO

A floresta de Mata Atlântica no Brasil vem sendo devastada nos últimos 500 anos. Atualmente restam apenas cerca de 8% da floresta original. Destes, a maior parte está sob precária condição e sofrendo contínua perda de biomassa vegetal e erosão genética, particularmente no Estado do Rio de Janeiro. Uma nova concepção de uso da terra, baseado em uma visão sistêmica do processo agrícola, em que os recursos naturais (solo, água e biodiversidade) são explorados de maneira sustentável, ambiental e economicamente, pelo homem, deve permear os programas de desenvolvimento agropecuário na Mata Atlântica.

A sustentabilidade do uso da terra depende, entre outros fatores, da manutenção ou incremento da qualidade do solo sob cultivo. Os bioindicadores são os menos estudados, e dentre estes particularmente a diversidade microbiana, elemento chave para a efetividade dos processos ecológicos do solo que dão sustentação ao crescimento vegetal, necessitam de desenvolvimento metodológico e determinação de parâmetros de qualidade do solo. Neste trabalho utilizamos técnicas avançadas de biologia molecular para caracterizar a diversidade bacteriana de solos de uma microbacia contendo ecossistemas sob mudanças contínuas, com diferentes tipos de cobertura vegetal (fragmentos de floresta em diferentes estágios sucessionais) e agroecossistemas (pastagem, cultivos anuais, bananal e cafezal).

MATERIAL E MÉTODOS:

Tratamentos: Localizada no município de Bom Jardim, RJ, Distrito de Barra Alegre, a propriedade Sítio da Cachoeira está na região de cabeceira do Córrego do Pito Aceso, inserido na Bacia do rio Paraíba do Sul. Seu proprietário, há mais de 50 anos, implementa um sistema de produção caracterizado pela divisão das propriedades em glebas, onde cultiva culturas anuais em rotação (inhame, milho e feijão) durante 3 anos, sendo depois deixadas em pousio, quando ocorre o crescimento de vegetação de capoeira primária. A reincorporação das glebas ao sistema de produção ocorre de 3 a 5 anos após o início do pousio. A área de estudo inclui ainda fragmentos florestais em estágios sucessionais distintos.

Coleta de Solos: As amostras do solo foram coletadas das seguintes glebas em janeiro de 2000:

- | | |
|------------------|------------------|
| • Café | • Cultivo 3 anos |
| • Pasto | • Pousio 1 ano |
| • Banana | • Pousio 5 anos |
| • Cultivo 1 ano | • Mata 15 anos |
| • Cultivo 2 anos | • Mata 30 anos |

- Mata 150 anos

Cada tratamento foi dividido em três parcelas, de acordo com a posição no terreno (terço superior, médio e inferior). Foram coletadas amostras indeformadas e deformadas (compostas de 6 sub-amostras de cada parcela. As amostras analisadas foram coletadas da profundidade de 0-5 cm.

Extração do DNA total de microrganismos do solo: A extração foi feita segundo o protocolo do Kit FastDNA® SPIN Kit for soils da Bio 101. O solo foi agitado com pérolas de vidro de diferentes tamanhos em um equipamento FastPrep ®. Após passar por tratamentos químicos o DNA foi purificado com resina de sílica e filtrado. O DNA total do solo foi preservado à - 20 °C até o momento da análise.

PCR: O DNA obtido das amostras de solo foi amplificado por PCR, utilizando-se iniciadores (ver tabela abaixo) que reconhecem os flancos da região do gene que codifica a subunidade beta da RNA polimerase *rpoB*. O produto de PCR é analisado em gel de agarose 1,4%.

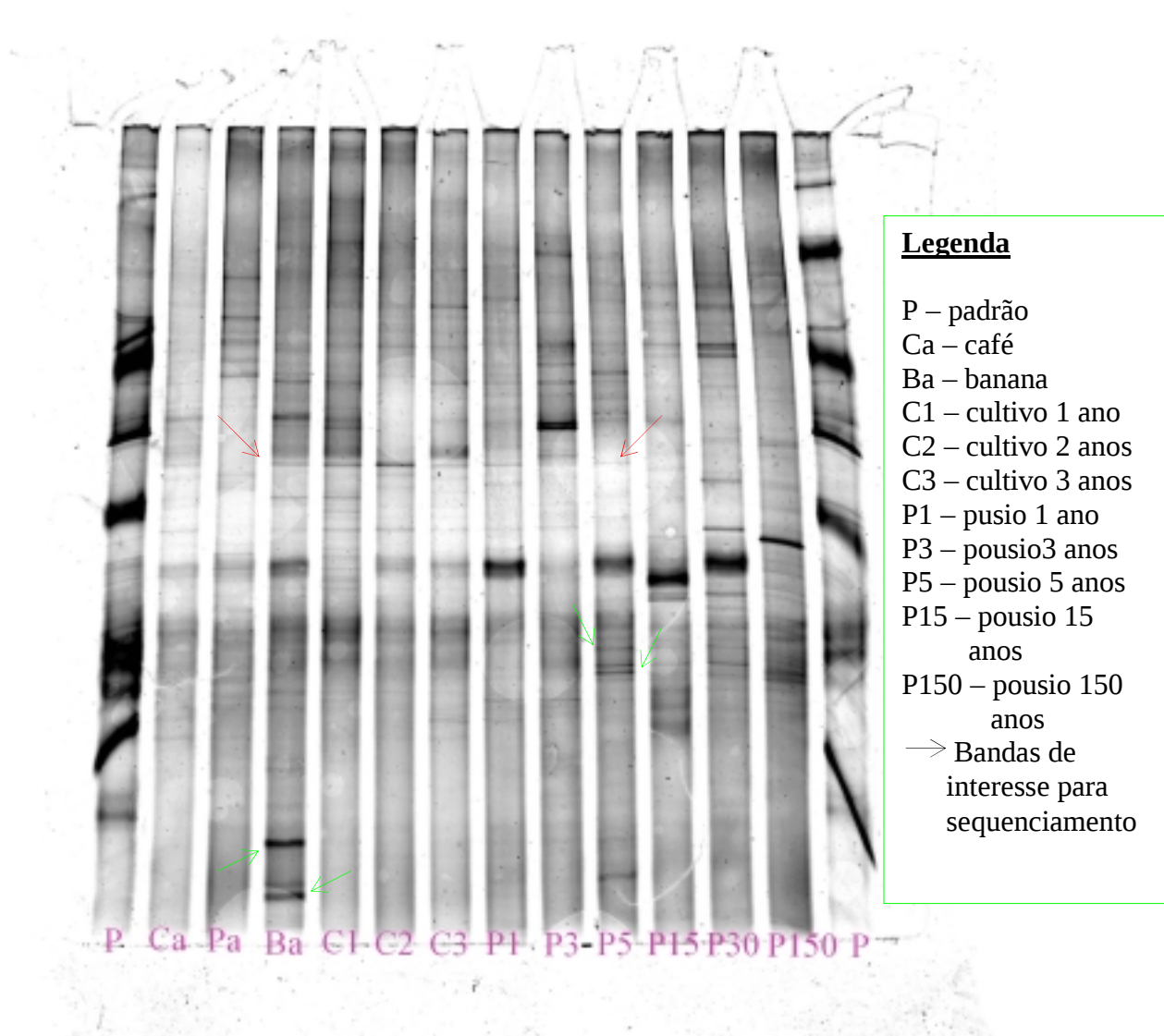
Iniciadores	Seqüência
1698f	5'AACATCggTTTgATCAAC3'
2041r	5'CgTTgCATgTTggTACCCAT3'
Grampo GC	5'CgCCCgCCgCgCgCggCgggCggggCgggggCACggggggg3'

DGGE: Os produtos de PCR foram analisados em um gel de gradiente de desnaturação, em uma unidade DGGE da Bio-Rad, em géis contendo 6% (wt/vol) de poliacrilamida e 1x TAE. Foi utilizado um gradiente de 35% - 65% de desnaturantes (uréia e formamida). O tempo de eletroforese foi de 18 horas à 60 °C e 75V. O gel foi corado por 40 minutos com SYBER Green I, observado em U.V. 366nm e fotografado.

RESULTADOS:

Os resultados demonstram uma ampla diversidade de bactérias em todos os tratamentos, representada pela grande quantidade de bandas. Foram observadas bandas com ocorrências em quase todos os tratamentos, indicando serem provenientes de espécies de bactéria comum em solos da região, e pouco influenciadas pelo tipo de uso da terra. No entanto, podem ser observadas pequenas diferenças entre os perfis de bandejamento de cada tratamento. Algumas bandas têm ocorrência específica em diferentes tratamentos (ver setas na Figura 01), e serão excisadas e seqüenciadas para análises posteriores. Foram observadas bandas que ocorrem apenas nos solos sob pousio por mais de 5 anos (setas verdes), outras ocorrem apenas nos solos sob cultivo agrícola e pousio até 5 anos (setas vermelhas). Até o momento foram analisadas 36 amostras de solo correspondendo às 3 repetições dos 12 tratamentos analisados. Uma análise visual não revelou diferenças significativas entre as repetições (não mostrado), indicando boa reprodutibilidade da metodologia adotada. Uma matriz de ausência e presença de bandas será construída para analisar a similaridade entre os tratamentos.

Figura 01. Gel de DGGE demonstrando a diversidade bacteriana das amostras de solo coletadas do terço médio de cada tratamento.



Discussão e Conclusões

A metodologia utilizada revelou-se apropriada para os objetivos do estudo e os resultados têm grande potencial para subsidiarem análises ecológicas sobre a dinâmica das estruturas de comunidades bacterianas do solo quando submetidos a diferentes pressões de uso ou de sucessão vegetal. Estas análises serão feitas correlacionando os resultados alcançados (similaridade entre os tratamentos) com a diversidade da fauna e atributos físicos e químicos do solo. As seqüências das bandas selecionadas serão alinhadas com as demais seqüências do gene *rpoB* presentes nos bancos de dados e avaliadas sua potencialidades como sondas indicadoras da qualidade do solo.

Referencia Bibliográfica:

DAHLLÖF, I.; BAILLIE, H.; KJELLEBERG, S. (2000). *RpoB*-Based microbiol community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Applied and Enviromental Microbiology*, v. 66 pp.3376-3380.

DORAN, J.W. & PARKIN, T.B. (1994) Defining and assessing soil quality. In: *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment* (J.W. Doran et al., eds.). SSSA 35 Special Publications, Madison, EUA, pp. 3-21.

MUYZER, G.; DE WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis anaysis o polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* V. 59 pp. 695-700.

ØVERÅS, L.;FORNEY,L.;DAAE,F.L.& TORSVIK,V. (1997)Distribution of Bacterioplankton in Meromictic Lake Saelenvannet, as Determined by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified Gene Fragments Coding for 16S rRNA. *Applied and Enviromental Microbiology* v.63 p. 3367-3373.

PEIXOTO R.S., DA COSTA COUTINHO H.L., RUMJANEK N.G., MACRAE A. & ROSADO A.S. (2002) Use *rpoB* and 16S rRNA genes to analyse bacterial diversity of a tropical soil using PCR and DGGE. *Lett Appl Microbial* v. 35 pp. 316-320.