

Antonio Lourenço Pinto

**ESTRUTURA DE COMUNIDADES MICROBIANAS DO SOLO  
EM ÁREAS DE RESTINGA PRESERVADAS DO PARQUE  
ESTADUAL DO RIO VERMELHO, FLORIANÓPOLIS, SC**

Trabalho de conclusão do Curso de Ciências Biológicas, apresentado pela disciplina TCC II, como requisito parcial para a obtenção do grau de Licenciatura em Ciências Biológicas.  
Orientador: Prof. Dr. Cláudio F. Soares  
Coorientador: Dr. Rafael D. de Armas

Florianópolis  
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do  
Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Pinto, Antonio Lourenço

Estrutura de comunidades microbianas do solo em áreas de restinga preservadas do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC / Antonio Lourenço Pinto ; orientador, Cláudio Roberto Fossêca Sousa Soares ; coorientador, Rafael Dutra de Armas. - Florianópolis, SC, 2015.

100 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. PCR-DGGE. 3. Degradação ambiental. 4. Comunidades microbianas do solo. 5. Pinus sp.. I. Soares, Cláudio Roberto Fossêca Sousa. II. Armas, Rafael Dutra de. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Antônio Lourenço Pinto

**ESTRUTURA DE COMUNIDADES MICROBIANAS DO SOLO  
EM ÁREAS DE RESTINGA PRESERVADAS DO PARQUE  
ESTADUAL DO RIO VERMELHO, FLORIANÓPOLIS, SC**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Florianópolis, 10 de julho de 2015

---

Prof. Carlos Pinto Dr.  
Coordenador do TCC

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Cláudio Roberto Fonseca Sousa Soares, Dr.  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Rafael Dutra de Armas, Dr.  
Coorientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Rubens Tadeu Delgado Duarte, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Kelly Justin da Silva, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina



A meu querido pai Moises pinto  
Ribeiro (in memoriam):

Pelo forte e influente desejo que  
manifestava em favor da continuidade  
dos meus estudos, ainda na minha  
infância.

Dedico.

A minha mãe Vergínia de Oliveira  
Ribeiro, a meus oito irmãos, esposa e  
filha e aos demais que me apoiaram e  
incentivaram.

Ofereço.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo magnífico dom da vida, pela fé ininterrupta e tudo o que tem me proporcionado por meio destas.

A Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) pelo financiamento do projeto, o que permitiu a sua realização.

Ao meu orientador Professor Cláudio Roberto F.S. Soares, por sua orientação, empenho, dedicação e apoio durante a realização deste.

Ao meu coorientador Rafael Dutra de Armas por tudo o que me ensinou, pela paciência, atenção e presteza durante a realização dos trabalhos e pelo companheirismo e humanismo imensurável.

A meus pais Vergínia e Moisés (*in memoriam*) pela educação apoio e orientação, base sólida e inabalável que ajudou na construção da minha personalidade e me sustenta em todos os momentos da minha vida.

A minha família em geral, pelo apoio, carinho, incentivo e orações. Sem elas com certeza não estaria aqui hoje. Obrigado por tudo que me ensinaram.

A minha primeira professora Maria de Lurdes Borges (*in memoriam*) pelo que ensinou, pela delicadeza em que me tratava e pelos atributos direcionados a minha pessoa de aluno quando citava o meu nome.

A meus professores do CEJA em especial as professoras Célia e Mara, pelo apoio incentivo e compreensão.

Ao Léo Born pelo empenho, apoio e incentivo a materialização do desafio e da autoestima.

Aos amigos do laboratório de microbiologia do solo pela compreensão, em especial a Andressa Danielli Canei e a Bianca Lucchesi Targhetta pelo companheirismo, co-operativismo e autoestima essencial para minha inserção e estabilização dentro deste departamento.





Antes de ser uma pessoa de sucesso seja antes uma pessoa de valores, pois o sucesso é supérfluo na ausência ou no esquecimento da essência humana (Autor desconhecido).



## RESUMO

O Parque Estadual do Rio Vermelho (PAERV), situado em Florianópolis, SC, abriga um dos poucos fragmentos de Mata Atlântica com áreas de restinga preservadas no país. No entanto, na década 60, parte da vegetação natural do PAERV foi suprimida pela introdução de espécies florestais alóctones, destacadamente do gênero *Pinus*, tendo como consequência ambiental a descaracterização da restinga do PAERV. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi de avaliar a estrutura das comunidades de bactérias e fungos do solo de áreas de restinga do PAERV, SC e relacioná-las com os atributos químicos do solo, dada a importância dos microrganismos para o estabelecimento e preservação de espécies vegetais. Para tanto, foram coletadas amostras de solo na camada de 0-10 cm, de três áreas de restinga preservadas, duas arbóreas (RI - restinga sujeita à inundação; RS – restinga seca) e uma herbácea (RM - restinga sob influência marinha). Além dessas áreas, amostras de solo da RI e RS sob influência do *Pinus* sp. (RI<sub>Pinus</sub> e RS<sub>Pinus</sub>, respectivamente) foram coletadas como áreas referência. O DNA das amostras de solo foi extraído e a estrutura das comunidades bacterianas e fúngicas avaliadas por PCR-DGGE. A estrutura das comunidades de bactérias não diferiu entre as áreas de restinga preservadas. Entretanto, comparando as áreas de RI e RS, as mesmas diferiram das áreas sob influência do *Pinus* sp., com redução do número de amplicons, comportamento semelhante ao observado para a estrutura das comunidades fúngicas. Quando avaliada a estrutura das comunidades fúngicas nas restingas preservadas, RM não diferiu de RI e RS, embora tenha apresentado um maior número de amplicons exclusivos, mas RI e RS diferiram significativamente. Os atributos químicos foram distintos entre as áreas de restinga preservadas, com pH, alumínio trocável, carbono orgânico total e acidez potencial (H + Al) com maior influência sobre a estrutura das comunidades microbianas das áreas de restinga preservadas. Dessa forma, pode-se concluir que comunidades fúngicas específicas foram selecionadas nas áreas RI e RS preservadas do PAERV, sendo tanto as comunidades bacterianas quanto fúngicas influenciadas pela presença de *Pinus* sp., demonstrando a importância da remoção de forma gradual dessa espécie alóctone para permitir o restabelecimento da biodiversidade das áreas de restinga do PAERV.

**Palavras-chave:** PCR-DGGE; *Pinus* sp.; degradação ambiental; atributos químicos do solo.



## LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1** - Distribuição das Unidades de Conservação em Florianópolis, SC..... 28
- Figura 2** - Localização e zoneamento do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC..... 30
- Figura 3** - Seleção das áreas de restinga para coleta das amostras de solo no PAERV..... 45
- Figura 4** - Esquema representativo da forma de coleta das 12 sub-amostras de solo de cada ponto de coleta das áreas de restinga do PAERV, Florianópolis, SC..... 47
- Figura 5** - Pontos de coleta das amostras de solo nas áreas de restinga do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC. .... 48
- Figura 6** - Agrupamento hierárquico baseado nos perfis de amplicons do gene rRNA 16S de Bacteria das amostras de solo de restinga marinha (RM) do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC ..... 54
- Figura 7** - Análise de MDS baseada nos perfis de amplicons do gene rRNA 16S de Bacteria das amostras de solo de restinga marinha (RM) do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC. RMA) área A (Δ); RMB) área B (□); RMC) área C (○). .... 55
- Figura 8** - Diagrama de Venn obtido a partir dos perfis de amplicons do gene rRNA 16S de Bacteria das amostras de solo da restinga marinha (RM) do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC. .... 56
- Figura 9** - Agrupamento hierárquico baseado nos perfis de amplicons do gene rRNA 16S de Bacteria das amostras de solo de restinga do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC ..... 58
- Figura 10** - Análise de MDS baseada nos perfis de amplicons do gene rRNA 16S de Bacteria das amostras de solo de restinga marinha (RM) (Δ), restinga sujeita à inundação (RI) (○), restinga seca (RS) (□) e restinga sujeita à inundação e restinga seca com presença de *Pinus* (RI<sub>Pinus</sub> (●) e RS<sub>Pinus</sub> (■)) do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC..... 59

**Figura 11** - Número de amplicons do gene rRNA 16S de Bacteria das amostras de solo de restinga marinha (RM), restinga sujeita à inundação (RI), restinga seca (RS) e restinga sujeita à inundação e restinga seca com presença de *Pinus* (RI<sub>Pinus</sub> e RS<sub>Pinus</sub>) do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC. .... 61

**Figura 12** - Diagrama de Venn obtido a partir dos perfis de amplicons do gene rRNA 16S de Bacteria das amostras de solo de restinga marinha (RM), restinga sujeita à inundação (RI) e restinga seca (RS) do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC. .... 61

**Figura 13** - Diagrama de Venn obtido a partir dos perfis de amplicons do gene rRNA 16S de Bacteria das amostras de solo de restinga sujeita à inundação (RI), restinga seca (RS) e restinga sujeita à inundação e restinga seca com presença de *Pinus* (RI<sub>Pinus</sub> e RS<sub>Pinus</sub>) do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC. .... 62

**Figura 14** - Agrupamento hierárquico baseado nos perfis de amplicons da região ITS de fungos das amostras de solo de restinga marinha (RM) do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC. .... 64

**Figura 15** - Análise de MDS baseada nos perfis de amplicons da região ITS de fungos das amostras de solo de restinga marinha (RM) do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC. .... 65

**Figura 16** - Diagrama de Venn obtido a partir dos perfis de amplicons da região ITS de fungos das amostras de solo da restinga marinha (RM) do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC. .... 66

**Figura 17** - Agrupamento hierárquico baseado nos perfis de amplicons da região ITS de fungos das amostras de solo de restinga do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC. .... 67

**Figura 18** - Análise de MDS baseada nos perfis de amplicons da região ITS de fungos das amostras de solo de restinga marinha (RM) (Δ), restinga sujeita à inundação (RI) (○), restinga seca (RS) (□) e restinga sujeita à inundação e restinga seca com presença de *Pinus* (RI<sub>Pinus</sub> (●) e RS<sub>Pinus</sub> (■)) do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC.. 68

**Figura 19** - Número de amplicons da região ITS de fungos das amostras de solo de restinga marinha (RM), restinga sujeita à inundação (RI), restinga seca (RS) e restinga sujeita à inundação e restinga seca com presença de *Pinus* ( $RI_{Pinus}$  e  $RS_{Pinus}$ ) do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC..... 70

**Figura 20** - Diagrama de Venn obtido a partir dos perfis de amplicons da região ITS de fungos das amostras de solo de restinga marinha (RM), restinga sujeita à inundação (RI) e restinga seca (RS) do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC. .... 71

**Figura 21** - Diagrama de Venn obtido a partir dos perfis de amplicons da região ITS de fungos das amostras de solo de restinga sujeita à inundação (RI), restinga seca (RS), restinga sujeita à inundação e restinga seca com presença de *Pinus* ( $RI_{Pinus}$  e  $RS_{Pinus}$ ) do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC. .... 71

**Figura 22** - Análise de componentes principais associando o perfil de amplicons da PCR-DGGE de bactérias com os atributos químicos do solo das áreas de restinga do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC..... 74





## LISTAS DE TABELAS

**Tabela 1** - Resultado do teste de similaridade por *Pairwise* (pareamento) baseado nos perfis de amplicons do gene rRNA 16S de Bacteria das amostras de solo das áreas de restinga marinha (RMA, RMB e RMC) do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC ..... 55

**Tabela 2** - Resultado do teste de similaridade por *Pairwise* (pareamento) baseado nos perfis de amplicons do gene rRNA 16S de Bacteria das amostras de solo de restinga marinha (RM), restinga sujeita à inundação (RI), restinga seca (RS) e restinga sujeita à inundação e restinga seca com presença de *Pinus* (RI<sub>Pinus</sub> e RS<sub>Pinus</sub>, respectivamente) do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC ..... 60

**Tabela 3** - Resultado do teste de similaridade por *Pairwise* (pareamento) baseado nos perfis de amplicons da região ITS de fungos das amostras de solo das áreas de restinga marinha (RMA, RMB e RMC) do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC..... 65

**Tabela 4** - Resultado do teste de similaridade por *Pairwise* (pareamento) baseado nos perfis de amplicons da região ITS de fungos das amostras de solo de restinga marinha (RM), restinga sujeita à inundação (RI), restinga seca (RS) e restinga sujeita à inundação e restinga seca com presença de *Pinus* (RI *Pinus* e RS *Pinus*, respectivamente) do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC..... 69

**Tabela 5** - Valores médios das análises químicas de solo das áreas de restinga marinha (RM), sujeita a inundação (RI) e seca (RS) do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC ..... 73



## LISTAS DE ABREVIATURAS

APP - Área de preservação permanente  
BFN - Bactérias fixadoras de Nitrogênio  
CONAMA - Conselho nacional do meio ambiente  
DGGE - Eletroforese em gel com gradiente desnaturante  
DNA - Ácido desoxirribonucleico  
dNTPs - Desoxirribonucleotídeos fosfatados  
EPAGRI - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de santa Catarina S.A.  
FATMA - Fundação de amparo à tecnologia e ao meio Ambiente  
IBF - Instituto Brasileiro de Florestas  
IBGE - Instituto brasileiro de geografia e estatística  
INMET - Instituto Nacional de Meteorologia  
MgCl<sub>2</sub> - Cloreto de magnésio  
MMA - Ministério do Meio Ambiente  
PAERV - Parque Estadual do Rio vermelho  
PAE - Parques Estaduais  
qPCR - quantitativo  
PCR - Reação em cadeia da polimerase  
PIB - Produto interno bruto  
RI - Restinga sujeita a inundação  
RI<sub>Pinus</sub> - Restinga sujeita à inundação sob influência de *Pinus* sp.  
RM - Restinga sob influência marinha  
RPPN - Reserva particular do patrimônio natural  
rRNA - Ácido ribonucléico ribossômico  
RS - Restinga seca  
RS<sub>Pinus</sub> - Restinga seca sob influência de *Pinus* sp.  
SEUC - Sistema estadual de unidades de conservação  
SNUC - Sistema nacional de conservação  
TAE - Tris-acetato-EDTA  
UC - Unidades de conservação



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	23
1.1 Bioma Mata Atlântica .....	23
1.2 Unidades de Conservação .....	26
1.2.1 Unidades de Conservação do estado de Santa Catarina .....	27
1.2.2 Parque Estadual do Rio Vermelho .....	29
1.2.2.1 Localização, vegetação e solo .....	29
1.2.2.2 Problemática do PAERV .....	31
1.3 Influência do <i>Pinus</i> sp. sobre os ecossistemas .....	33
1.4 Importância do ambiente de Restinga .....	34
1.5 Importância dos microrganismos na manutenção dos ecossistemas. .....	37
1.6 Técnicas para detecção de microrganismos no ambiente .....	39
2. OBJETIVOS .....	43
2.1 Objetivo geral.....	43
2.2 Objetivos específicos.....	43
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	45
3.1 Seleção das áreas de restinga e amostragem .....	45
3.2 Caracterização da estrutura das comunidades microbianas.....	49
3.2.1 Extração do DNA metagenômico.....	49
3.2.2 PCR-DGGE.....	49
3.3 Análise estatísticas .....	50
4. RESULTADOS .....	53
4.1 Comunidades bacterianas das áreas de restinga do PAERV .....	53
4.1.1 Comunidades bacterianas das áreas de restinga marinha do PAERV.....	53
4.1.2 Comparação entre as estruturas das comunidades bacterianas das áreas de restinga do PAERV .....	57
4.2 Comunidades fúngicas das áreas de restinga do PAERV.....	63
4.2.1 Comunidades fúngicas das áreas de restinga marinha do PAERV .....	63
4.2.2 Comparação entre as estruturas das comunidades fúngicas das áreas de restinga do PAERV .....	66
4.3 Correlação entre as comunidades microbianas e os atributos químicos das amostras de solo das áreas de restinga do PAERV .....	72
5. DISCUSSÃO.....	77
6. CONCLUSÕES.....	85
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	87
REFERÊNCIAS .....	89



## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Bioma Mata Atlântica**

O território brasileiro, por ter dimensões continentais e possuir variações no relevo, precipitação pluviométrica, temperatura e algumas regiões com estações anuais bem definidas, caracteriza-se por abrigar uma das maiores e mais diversas biodiversidades do mundo. Este patrimônio biológico encontra-se distribuído em inúmeros ecossistemas e complexos ambientes naturais, representado por seis biomas continentais: bioma Amazônia (49,29 % da área total do Brasil), bioma Cerrado (23,92 %), bioma Mata Atlântica (13,04 %), bioma Caatinga (9,92 %), bioma Pampa (2,07 %) e bioma Pantanal (1,76 %) (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2004).

O bioma Mata Atlântica, que originalmente ocupava todo o território costeiro do Brasil, com aproximadamente 1.300.000 km<sup>2</sup>, distribuídos em 17 estados, hoje conta com cerca de 22 % de sua cobertura original. Apesar da sua degradação, apresenta uma das maiores áreas de floresta tropical do mundo, sendo o segundo em extensão nas Américas, atrás apenas da floresta Amazônica (IBGE, 2004).

O bioma Mata Atlântica é um dos mais ricos em biodiversidade de animais e vegetais no mundo, possuindo as mais elevadas taxas de endemismo (PRADO, VASCONCELOS e CHIODI, 2014). Estima-se que este bioma agrega em seu domínio uma rica fauna, com cerca de 270 espécies de mamíferos, 992 de pássaros, 372 de anfíbios, 197 de répteis e 350 de peixes, com 105, 160, 183, 60 e 133 espécies endêmicas, respectivamente, além de 20 mil espécies vegetais, sendo oito mil endêmicas (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA, 2014).

A diversidade vegetal, associada à fatores físico-químicos, geológicos, eólicos, climáticos e de posicionamento global, determinam diferentes fitofisionomias nesse bioma, sendo elas: floresta ombrófila densa, floresta ombrófila mista (também

denominada de mata de araucárias), floresta estacional semidecidual, floresta estacional decidual e ombrófila aberta, além dos ecossistemas associados como as restingas, manguezais, campos de altitude, brejos interioranos e ainda ilhas oceânicas no litoral (PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA, 2006; MMA, 2014).

Embora não tenha perdido sua importância ecológica a partir da degradação sofrida, o bioma Mata Atlântica conta apenas com 7 % de sua extensão original conservada em fragmentos acima de 100 hectares, conflitando-se com princípios da ecologia que referendam que quanto maior o tamanho dos fragmentos, maior é o número de habitats e, conseqüentemente, maior é o fluxo gênico entre as espécies, facilitando assim a ocorrência e sobrevivência de uma maior biodiversidade (MELO, 2012). Fragmentos pequenos são influenciados pelo efeito de borda, o que diminui a razão interior/margem, e impõe restrições à manutenção de populações de determinadas espécies que necessitam de uma área maior para viver (NAMARA, MOREAU e MORAES, 2011).

A degradação do bioma Mata Atlântica ocorreu devido aos impactos coloniais, seguido da explosão demográfica e do aumento da exploração econômica, intensiva e desordenada (correspondendo a 70 % do PIB nacional), resultando na sua fragmentação. Cerca de 70 % da população brasileira, ou seja, em torno de 120 milhões de pessoas, reside nesse bioma (GUEDES e SEEHUSEN, 2011). Esse conjunto de fatores confere ao bioma Mata Atlântica, atualmente, o atributo de um dos cinco biomas mais ameaçados de extinção no planeta. A maior parte dos animais e vegetais em vias de extinção no Brasil tem origem nesse bioma, sendo caracterizado como um dos ambientes mais frágeis do planeta (MMA, 2014).

A megabiodiversidade do bioma Mata Atlântica é considerada patrimônio nacional. Trata-se, inequivocamente, de um bioma brasileiro ameaçado de extinção que figura como um dos mais importantes ameaçados no mundo. Neste cenário, se medidas de preservação e recuperação não forem urgentemente adotadas, o mesmo corre sérios riscos de desaparecer, visto que, das sete espécies brasileiras de animais consideradas extintas em



tempos recentes, todas se encontravam distribuídas na Mata Atlântica (MMA, 2014). Apesar do alto nível de fragmentação e da alta densidade humana, o bioma Mata Atlântica ainda abriga 383 das 633 espécies animais ameaçadas de extinção no Brasil (PERES, 2010).

O estado de Santa Catarina não está alheio a esse problema, sendo o sétimo estado brasileiro com menor extensão territorial do país, possui 95,3 km<sup>2</sup> e 9,5 milhões de ha, sendo que desses, 85,5 % estavam originalmente cobertos por Mata Atlântica. Atualmente, abriga cerca de 17 % do pouco que ainda resta da Mata Atlântica no Brasil, o equivalente a 1.662.000 ha, sendo 280.000 ha de florestas primárias e 1.382.000 ha de florestas secundárias (VITALI e UHLIG, 2010).

A ilha de Florianópolis, situada no litoral do estado de Santa Catarina, perfaz uma área de 39.900 ha, sendo constituída por vegetações pioneiras, floresta ombrófila densa, extensas planícies de maré, costões rochosos graníticos, manguezais, dunas e praias. Possui um perímetro total de 172 km, representados por 88 km de praias, 71 km de costões e restingas e 14,5 km de manguezais e marismas, além de lagoas e lagoas (HORN FILHO, 2006). Esta cidade, por conta da vocação turística e de sua localização geográfica estratégica, sofreu, nessas últimas décadas, grandes pressões antrópicas, desencadeando nos últimos tempos, um crescimento expressivo e desordenado dos empreendimentos imobiliários e um aumento da densidade populacional no município. Isso tem ocasionado graves impactos ecossistêmicos e suscitado preocupações ambientais em torno da criação de medidas compativelmente sustentáveis, que visem à manutenção, preservação e recuperação do caráter atrativo natural (HORN FILHO, 2006). Em razão disso, da porção original de Mata Atlântica da ilha, restam apenas 12,7 %, distribuídas nas encostas e topos de morros (HORN FILHO, 2006).

Por outro lado, em meio às evidências desse cenário, registra-se o aumento do número de Unidades de Conservação (UC) no bioma Mata Atlântica, onde tem-se as maiores e mais importantes superposições de decreto de proteção aliados há um

dos mais complexos processos de vigilância e estudo (PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA, 2006). A maior parte dos 7 % da conformação original da Mata Atlântica que ainda resiste, se faz presente dentro destas áreas, entre elas o Parque Estadual do Rio Vermelho em Florianópolis, SC.

## **1.2 Unidades de Conservação**

Com o objetivo de assegurar o bem-estar das populações humanas e à preservação dos recursos naturais existentes no território brasileiro, as políticas governamentais para proteção do bioma Mata Atlântica vêm sendo ampliada nos últimos anos. Dentre os mecanismos de controle e proteção do bioma, encontramos a Lei nº 9.985, de 18 de julho de 2000, que instituiu o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza (SNUC) (SNUC, 2000). Segundo o SNUC, que é regido pelas esferas federais e municipais, as UC tem por objetivo assegurar a representatividade de amostras significativas e ecologicamente viáveis das diferentes populações, habitats e ecossistemas do território nacional e das águas jurisdicionais, preservando o patrimônio biológico e recursos genéticos existentes (MMA, 2014).

As UC encontram-se divididas em duas categorias principais: Unidades de Proteção Integral e Unidades de Uso Sustentável. As Unidades de Proteção Integral tem por finalidade preservar a natureza, sendo admitido apenas o uso indireto dos recursos naturais. Pertencem a este grupo as categorias: Estação Ecológica, Reserva Biológica, Parque Nacional, Refúgio da Vida Silvestre e Monumento Natural. Já as Unidades de Uso Sustentável harmonizam a conservação da natureza com o uso de parte dos recursos de forma sustentável. Fazem parte deste grupo as seguintes categorias: Área de Proteção Ambiental, Área de Relevante Interesse Ecológico, Floresta Nacional, Reserva Extrativista, Reserva de Fauna, Reserva de Desenvolvimento Sustentável e Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) (MMA, 2014).

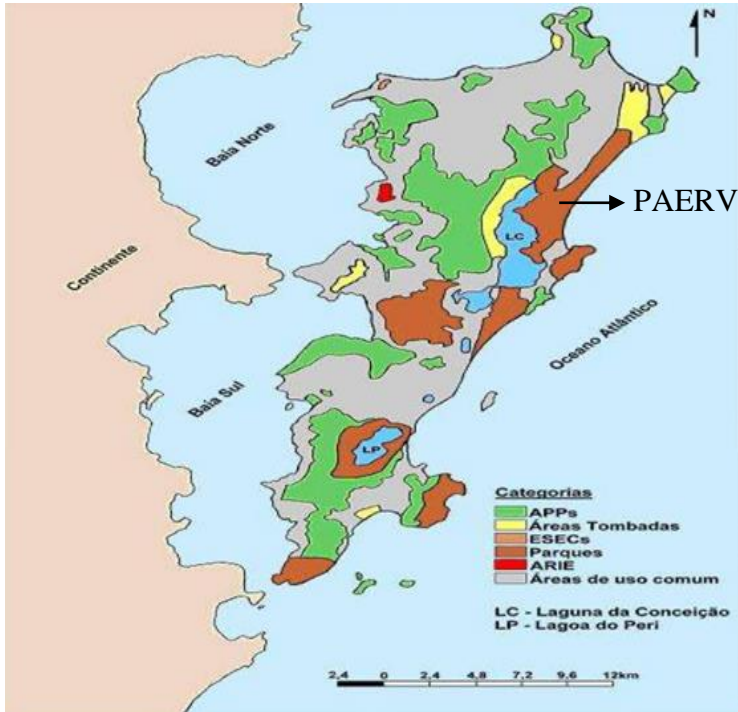
### 1.2.1 Unidades de Conservação do estado de Santa Catarina

O estado de Santa Catarina, com uma extensão territorial de 95.736,165 km<sup>2</sup> (IBGE, 2004), é o terceiro estado brasileiro em área de Mata Atlântica, estando 100 % inserido nesse Bioma. Até o início do século passado, menos de 5 % desse bioma havia sido destruído. Entretanto, atualmente restam apenas 22,9 % de áreas preservadas, e dessas, a grande maioria são florestas secundárias, pois o desmatamento em florestas primárias ricas em biodiversidade ainda é evidente (MEDEIROS, 2005).

Com o intuito de assegurar a preservação do patrimônio natural, a manutenção das funções ecológicas e o bem estar da população humana, iniciaram-se neste estado, a partir da década de 70, os processos de implementação de UC. Com 118.982,47 ha de área de preservação, o estado de Santa Catarina possui 12 UC, distribuídas em sete Parques Estaduais (PAE), que são mais flexíveis quanto ao uso de suas áreas (o acesso ao público é normatizado, mas permitido), três Reservas Biológicas (REBIO), onde o manejo ambiental é bastante restrito (com permissão de acesso somente a pesquisadores) e duas Estações Ecológicas (ESEC) (VITALI e UHLIG, 2010).

Florianópolis possui 45 % do seu território formado por UC (Figura 1), as quais estão distribuídas nas categorias de UC estabelecidas pelo SNUC, sendo elas: Área de Preservação Permanente (APP), destacando-se os manguezais do Itacurubi (o maior mangue urbano do mundo), Saco Grande, Tapera, Ratonés e Rio Tavares; Área de Relevante Interesse Ecológico (ARIE), destacando-se a do Desterro; Área Tombada (AT), como as dunas dos Ingleses, Santinho, Campeche e Pântano do Sul, Lagoa da Chica, Lagoa Pequena e Costa da Laguna da Conceição, Floresta do Hospital de Caridade e restingas de Ponta das Canas e do Sambaqui; Estação Ecológica (ESEC), destaca-se a Estação Ecológica de Carijós; HF Horto Florestal (HF), destaca-se o Horto Florestal de Canavieiras; Reserva Extrativista (RESEX), como a Reserva Extrativista do Pirajubaé; e Parques, entre eles podemos citar o Parque Estadual da Serra do Tabuleiro e o Parque Estadual do Rio Vermelho, assim como os Parques

municipais da Lagoa do Peri, Praia da Galheta, Maciço da Costeira, Lagoinha do Leste, Dunas da Laguna da Conceição, Córrego Grande e Cidade das Abelhas (HORN FILHO, 2006).



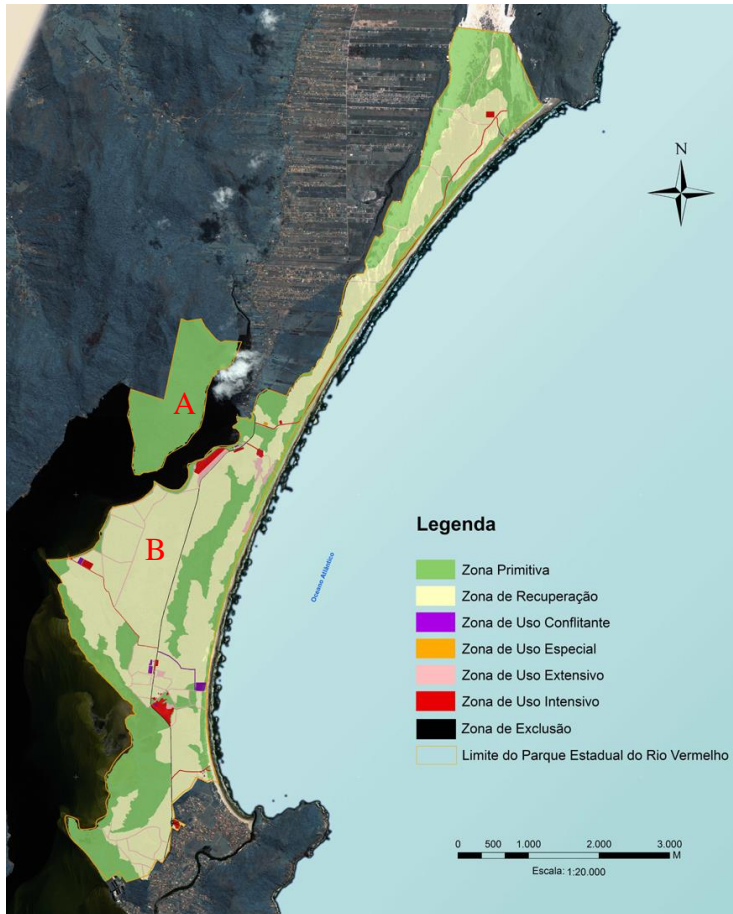
**Figura 1** - Distribuição das Unidades de Conservação em Florianópolis, SC. APPs: Áreas de Preservação Permanente; ESECs: Estações Ecológicas; ARIE: Área de Relevante Interesse Ecológico; PAERV: Parque Estadual do Rio Vermelho (Fonte: Adaptado de Horn Filho, 2006).

## 1.2.2 Parque Estadual do Rio Vermelho

### 1.2.2.1 Localização, vegetação e solo

Dentre as UC na categoria Parques Estaduais (PAE), pode-se destacar o Parque Estadual do Rio Vermelho (PAERV), localizado na região nordeste da ilha de Florianópolis, entre as latitudes 27°35' sul, 27°29' norte e longitudes 48°26' oeste e 48°22' leste. Seus limites são os distritos da Barra da Lagoa ao sul e distrito de São João do Rio Vermelho ao norte e a Lagoa da Conceição e Serra Litorânea ao oeste. Possui relevo com baixa altimetria, sendo predominantemente plano (FUNDAÇÃO DO MEIO AMBIENTE - FATMA, 2015). Constituído por uma área de 1.532 ha, onde possui 131,4 ha com predomínio da Mata Atlântica (floresta ombrófila densa), situada no Morro dos Macacos, a oeste da Lagoa da Conceição, composta por uma minúscula parcela da Serra Litorânea, e em sua maioria, por 1400,9 ha de vegetação de Restinga de diferentes alturas, composta pela Planície Costeira perfazendo aproximadamente 7,5 km de extensão no sentido sul/norte (Figura 2). A vegetação original é a de restinga, composta por formações herbáceas, arbustivas e arbóreas, como a endêmica *Mimosa chatarinensis* (FATMA, 2015).

Os solos, geologicamente recentes, são constituídos por depósitos sedimentares continentais e litorâneos resultantes da ação fluvial, marinha, flúvio-marinha, lagunar, colúvio-aluvionar e eólica. São de origem cenozóica quaternária, com perfis arenosos, pobres em fertilidade, com baixa retenção de água, pouco desenvolvidos e com grande suscetibilidade a erosão hídrica (HORN FILHO, 2006).



**Figura 2** – Localização e zoneamento do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC. A) área do Morro dos Macacos inserida na Serra Litorânea, com predomínio da floresta ombrófila densa; B) planície costeira, com predomínio de vegetação de restinga (Fonte: Adaptado de (FERREIRA, 2010).

### 1.2.2.2 Problemática do PAERV

O PAERV foi criado, a partir do Decreto nº 308 de 24 de maio de 2007, com o objetivo de preservar floresta ombrófila densa, restinga e fauna associadas a esse domínio, além do complexo hídrico presente na área.

Quando o PAERV pertencia à categoria de estação florestal do Rio Vermelho, foi incentivada na década de 60, a partir do decreto 2006 de 21 de setembro 1962, editado durante a gestão do governador Celso Ramos, em resposta a lei federal de incentivos fiscais, decreto nº 5.106 de 1966, à busca por fontes alternativas de reflorestamento em terras não agricultáveis. Ou seja, para avaliar a viabilidade de produção florestal em áreas de restinga, consideradas improdutivas, parte considerável dessa vegetação foi suprimida e substituída, devido à introdução experimental de diversas espécies exóticas florestais, destacadamente dos gêneros *Pinus* e *Eucalyptus* (BERENHAUSER, 1972).

A introdução de espécies exóticas e a supressão das espécies vegetais nativas, que perdurou até meados da década de 70, tiveram como consequência ambiental a descaracterização de grande parte da restinga do PAERV.

Em 1963, a vegetação de restinga do PAERV foi praticamente toda substituída por 25 espécies de *Pinus*, principalmente *P. elliottii* e *P. taeda*. A implantação foi de cerca de 487 ha de *Pinus* spp. e de 3 ha de *Eucalyptus* spp. (CARUSO, 1983). A descaracterização do estado natural da restinga, principalmente pela introdução de *P. elliottii* na praia do Moçambique, a mais extensa de Florianópolis (12,5 km), situada dentro do PAERV, é tida como um dos principais problemas de degradação nos ecossistemas costeiros da ilha (HORN FILHO et al., 2000), pois não permite o desenvolvimento e sobrevivência da flora e fauna nativos, levando ao desequilíbrio ecológico (CARUSO, 1983).

Estudos demonstram que a segunda maior causa de extinção de espécies nativas no mundo está relacionada com a ação invasiva de espécies exóticas, pois, de uma forma geral,

possuem grande poder dispersivo na ausência de mediadores. Este processo, sem intervenção, é conhecido como dispersão natural ou contaminação biológica, referindo-se aos danos causados por espécies que não fazem parte, naturalmente, de dado ecossistema, mas que se estabelecem, passam a se dispersar e provocam mudanças em seu funcionamento, não permitindo a sua recuperação natural (ZILLER, 2000).

A degradação ambiental pela presença de espécies exóticas só é superada pela perda e fragmentação de habitats (PORTZ *et al.*, 2011), sendo o gênero *Pinus* considerado o maior causador de extinções de ecossistemas por invasão (BECHARA, 2003). Apesar da insistente descaracterização dos ecossistemas do PAERV pela introdução de *Pinus* spp. e *Eucalyptus* spp., esse ainda resiste com aproximadamente 400 hectares de floresta ombrófila densa conservadas, exceto algumas áreas de topos de morro invadidas por *Pinus*.

Há também em torno de 250 hectares em fragmentos de restingas conservadas, habitados por diversas espécies ameaçadas de extinção, tais como *Scaevola plumieri* (Mangue-da-praia), a endêmica *Mimosa catharinensis* e também a espécie rara *Aristolochia robertii* (Cipó milhomens), que só ocorre no PAERV e em Torres, RS (FALKENBERG, 1999).

O manancial subterrâneo, aquífero Ingleses-Rio Vermelho, com aproximadamente 70 m de profundidade e 20,47 km<sup>2</sup> de extensão, possui parte de sua área sob o Parque, em uma condição natural estratégica para Florianópolis, visto que responde pelo suprimento de água potável para o norte da Ilha (FATMA, 2015), cerca de 20 % da população fixa do município, sendo as dunas da restinga uma importante área de recarga subterrânea. Os incêndios e a contaminação biológica por *Pinus* geram uma condição desfavorável que afeta a recarga e a proteção do aquífero, comprometendo a qualidade e a quantidade de água (FERREIRA, 2010).

Além da importância ambiental o Parque possui relevância cultural e histórica. Um dos sambaquis mais antigos da ilha de Santa Catarina, datado de 5.020 anos, está localizado no Parque. O Distrito de São João do Rio Vermelho, localizado no limite



norte do Parque, é um dos mais antigos de Florianópolis, sendo criado oficialmente em 1831 (FATMA, 2015).

Dessa forma, além de essencial a preservação das áreas conservadas, louvável também é a recuperação daquelas que foram descaracterizadas pelo plantio e a contaminação biológica por *Pinus* spp. e *Eucalyptus* spp. no PAERV, visando à preservação de espécies vegetais nativas, e a consequente manutenção do equilíbrio da biodiversidade associada a essas espécies vegetais.

Quanto ao aquífero Ingleses/Rio Vermelho, por ter parte de sua extensão alocada sob o Parque, espera-se, a partir da recuperação ambiental do Parque, uma melhora em sua constante recarga e proteção, pois com a condição desfavorável provocada pela instalação das espécies exóticas, também teve a sua quantidade e qualidade de água comprometida.

Neste contexto, há a necessidade de adoção de programas de revegetação com espécies nativas nestes locais, no entanto, devido aos solos pobres nutricionalmente nas áreas de restinga do PAERV, e mais ainda naquelas contaminadas com *Pinus*, o estudo da estrutura de comunidades bacterianas e fúngicas nas áreas preservadas é essencial devido a sua posição primária na cadeia trófica dos ecossistemas e a conhecida promoção do crescimento vegetal de alguns grupos de microrganismos.

### **1.3 Influência do *Pinus* sp. sobre os ecossistemas**

Das espécies vegetais exóticas frequentemente invasoras de ecossistemas, o *Pinus* sp. destaca-se como ameaça para a biodiversidade global. Como destacado anteriormente, a segunda maior causa de extinção de espécies no mundo está relacionada com espécies invasoras de origens e tipos diversos, cuja introdução inicial, na maioria das vezes, é voluntária e decorre de finalidades ornamentais, paisagísticas e econômicas. Sobre tudo, não são considerados o poder dispersivo, a adaptabilidade intrínseca a outros ambientes e as influências que as mesmas exercem sobre a biodiversidade local (VALDUGA, 2014).

As espécies de *Pinus* são nativas do hemisfério norte, sendo introduzidas no ano de 1948 no Brasil, no estado de São Paulo. Na ocasião cinco espécies de *Pinus* foram plantadas, destas apenas *P. taeda* e *P. elliottii* tiveram melhor adaptação as condições locais. Desde então, à medida que ambas se tornaram conhecidas, passaram a ganhar prestígio e espaço físico para inserção nas propriedades rurais, estendendo-se para o Sul e Sudeste do país (BOURSCHEID e REIS, 2010).

O interesse agro-econômico gerado entorno do *Pinus* sp. foi impulsionado pela demanda de produção de matéria prima para indústria madeireira e derivados. Dado ao perfil econômico e as condições geoclimáticas, a região Sul do Brasil, com 1.417 ha, registra hoje a maior área de reflorestamento cultivado de *Pinus* sp. do país, com produção de madeira para diversos fins (MMA, 2009). No entanto, pelo fato de não serem adotadas medidas de prevenção contra a disseminação do *Pinus* em áreas próximas, atualmente convive-se com altos índices de invasão e descaracterização ambiental de áreas destinadas à agricultura, pecuária, e de locais com vegetações arbustivas, arbóreas, esparsas, herbáceas, gramíneas, sub-bosques e de restingas, mesmo em área de preservação natural, onde o objetivo básico é a preservação de espécies nativas como ocorre no Parque Estadual de Itapuã, em Viamão, RS (PORTZ *et al.*, 2011) e no PAERV (CARUSO, 1983; BECHARA, 2003).

Além de acarretar perda de espécies no ecossistema, *Pinus* sp. tende a ocasionar alterações em propriedades ecológicas essenciais, como ciclagem de nutrientes e produtividade vegetal, cadeias tróficas, estrutura, dominância, distribuição e funções de espécies (ZILLER, 2000).

#### **1.4 Importância do ambiente de Restinga**

Devido ao fato das áreas de restinga do PAERV terem como problemática principal, determinante para sua preservação, a presença de *Pinus*, é importante ressaltar a preocupação em preservar esse ecossistema pela sua importância ecológica e social.

As flutuações do nível do mar que ocorreram no período Holoceno inferior, com a transgressão, e no Holoceno médio, caracterizada pela regressão do nível do mar, levaram a formação de vastas planícies sedimentares arenosas ao longo da costa brasileira. Este material foi parcial ou totalmente retomado pelas correntes de deriva litorânea e transportado até obstáculos, possibilitando o aprisionamento destes sedimentos, interrompendo esta via de transporte. Formaram-se então as planícies quaternárias arenosas, constituídas pela sucessão de cristas arenosas e cavas, caracterizando o ambiente de restinga (ASSUMPCÃO e NASCIMENTO, 2000).

As restingas, consideradas como conjunto de ecossistemas do Bioma Mata Atlântica e com variações locais, distribuem-se geograficamente ao longo do litoral brasileiro em pontos específicos, na extensão de mais de 5.000 km, não ocorrendo de forma contínua (GUSMÃO *et al.*, 1992). Ocupam 80 % do litoral brasileiro e constituem um espaço geográfico formado sempre por depósitos arenosos de origem marinha, lagunar, eólica ou formada a partir destas nas zonas costeiras do continente, paralelos à linha da costa, de forma geralmente alongada e acompanhando a extensão da praia (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA, 1999).

Assim como nos manguezais, a vegetação de restinga possui características adaptativas que possibilitam seu desenvolvimento nesse ambiente, como a resistência à salinidade oriunda do ambiente oceânico, à escassez de água doce, aos fortes ventos, à intensa arenização do solo e à pobreza de nutrientes.

Historicamente, em função da localização estratégica de acesso e do poder de navegabilidade associado a grande extensão de sua costa leste, as áreas de restinga vem sendo degradadas desde o princípio da colonização, a começar pelos ciclos do pau-brasil, cana-de-açúcar, extração de minerais, pelo adensamento populacional em maior escala ao longo da costa litorânea e pela agricultura de subsistência (IVANAUSKAS e ASSIS, 2009).

Recentemente, os maiores impactos são produzidos pela industrialização, habitação desordenada e especulação imobiliária. As consequências dessa ocupação referem-se à

eliminação da vegetação natural, ao estímulo dos processos erosivos, às alterações no processo natural de drenagem por cortes e aterros do solo, que ocasionam escoamento, supressão ou afloramento do lençol freático, à geração de lixo e esgoto doméstico, em geral sem tratamento adequado, e ao aumento da extração de recursos naturais, como areia e madeira para a construção civil (MAGNAGO, MARTINS e PEREIRA, 2011).

Aliado a degradação do ambiente de restinga cabe destacar sua fragilidade, sendo um ecossistema com pouca capacidade de resiliência, atribuída ao fato da vegetação se encontrar sobre solos arenosos, altamente lixiviados e pobres em nutrientes. A supressão da vegetação ocasiona uma reposição lenta, geralmente de porte e diversidades menores, onde algumas espécies passam a predominar (CONAMA, 1999).

O Brasil segue a tendência mundial da população, em ocupar as áreas adjacentes ao litoral. A média do índice habitacional humano nas formações das zonas litorâneas é de 26 % da população do país, o equivalente a 50,7 milhões de habitantes (IBGE, 2004). Entretanto mais de 50 % da atual população, mesmo que de forma ocasional, já ocupam tais zonas no Brasil. Já a região costeira de Santa Catarina abriga ao longo dos seus 538 km de litoral, distribuídos as margens do oceano Atlântico Sul, cerca de 36 % da população catarinense (HORN FILHO, 2006).

Para conter a degradação, e garantir o exercício de sua importante função ecológica e ambiental de fixadoras de dunas e estabilizadoras de manguezais, as restingas são enquadradas em Áreas de preservação permanente (APP), não podendo ser devastadas ou ocupadas em faixa mínima de 300 m, estimados a partir da linha de preamar, ou em qualquer localização ou extensão recoberta por vegetação com função fixadora de dunas ou estabilizadora de mangues (CONAMA, 1999).

A partir das informações ressaltadas torna-se evidente a necessidade da preservação e a recuperação de áreas de restinga degradadas. No entanto, como ressaltado anteriormente, o ambiente de restinga é frágil e de baixa resiliência, devido principalmente as condições nutricionais do solo, dificultando o

estabelecimento das espécies vegetais nativas. No entanto, estudos demonstram uma correlação positiva entre a riqueza de espécies vegetais e a riqueza de microrganismos, indicando que a diversidade de microrganismos tem papel fundamental no estabelecimento das espécies vegetais, além de estar diretamente relacionado com a estabilidade do ecossistema (BAUDOIN, BENIZRI e GUCKERT, 2003).

### **1.5 Importância dos microrganismos na manutenção dos ecossistemas**

Nos ambientes de restinga a comunidade microbiana pode representar um banco genético para a pesquisa e desenvolvimento de técnicas de conservação dos seus remanescentes florestais, de recuperação de seus percentuais degradados ainda passíveis e viáveis a este processo, e a implementação de novos produtos biotecnológicos, considerando-se que os microrganismos representam as formas de vida mais abundantes e diversificadas do planeta, e detêm a maior proporção da diversidade genética existente (LAMBAIS *et al.*, 2005).

Em solos de restinga, pela sua baixa fertilidade, a camada orgânica presente nos primeiros centímetros pode ser considerada de suma importância, visto que, em trabalho realizado nesse ambiente, na observação de estágios sucessionais do processo de recuperação natural, em áreas com aproximadamente 46 anos de revegetação, onde a camada superficial do solo foi removida, esta floresta encontra-se ainda em estágio inicial de recuperação (DOMINGOS *et al.*, 1997).

Os microrganismos cumprem importantes papéis em praticamente todos os ecossistemas, onde coexistem e se inter-relacionam. A existência e diversidade dos seres vivos no planeta estão intimamente ligadas à diversidade e atividade metabólica de microrganismos. Dentre os principais microrganismos, destacam-se fungos e bactérias, atuando na transformação/decomposição de compostos orgânicos e inorgânicos complexos, tornando-os acessíveis/assimiláveis ou inofensivos para outros organismos. Estes microrganismos participam da ciclagem de matéria

orgânica, dos ciclos biogeoquímicos e da manutenção da fertilidade e estrutura dos solos (DOCHERTY e GUTKNECHT, 2012).

Os fungos atuam na degradação de compostos aromáticos, lignina, celulose e hemicelulose, e na formação e manutenção estrutural do solo. Já as bactérias atuam como decompositoras e saprófitas, tendo função simultânea aos fungos na decomposição de resíduos orgânicos e ainda no controle de poluentes e parasitas vegetais (TEDERSOO *et al.*, 2014).

Parte dos processos indispensáveis para o funcionamento e sustentabilidade dos ecossistemas florestais são atribuídos aos fungos e bactérias, decorrendo na forma simbiótica. Uma associação denominada micorriza ocorre entre alguns fungos que circundam ou mesmo penetram nas raízes da maioria das plantas, favorecendo a absorção de água e nutrientes como zinco, manganês e cobre, mas principalmente fósforo, em contrapartida recebem do hospedeiro açúcares e aminoácidos que precisam para sobreviver. Os fungos estão intimamente relacionados à vegetação do local, e por isso, alterações na vegetação podem selecionar determinados grupos de fungos (NIELSEN *et al.*, 2010).

Já as bactérias, fixadoras de nitrogênio (BFN), penetram nas raízes de plantas da família das leguminosas, transformando o nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) em nitrito e nitrato, assimilável pelas plantas, para que possam sintetizar suas proteínas e outros compostos. Por outro lado, a planta fornece energia para que o processo possa ser realizado por esses microrganismos (JESUS *et al.*, 2009).

Dessa forma, os microrganismos do solo são fundamentais na manutenção dos ecossistemas, e assim, torna-se evidente a importância de conhecer a estrutura das comunidades desses organismos na manutenção da flora e, conseqüentemente, de toda cadeia trófica das UCs, visando preservar ou recuperar áreas degradadas ou contaminadas com *Pinus* como é o caso do PAERV.

## 1.6 Técnicas para detecção de microrganismos no ambiente

Estudos têm sido desenvolvidos para identificar os microrganismos presentes nos diferentes ambientes utilizando métodos dependentes de cultivo. No entanto, pela dificuldade de cultivá-los em meios artificiais, onde estima-se que entre 0,1 e 10 % dos microrganismos sejam cultivados, apenas uma pequena porção das comunidades é avaliada (AMANN, LUDWIG e SCHLEIFER, 1995). Além disso, muitos desses microrganismos não são dominantes nas comunidades de onde são isolados, sendo selecionados pela sua habilidade de desenvolvimento em meios de cultura com altas concentrações de nutrientes (HUGENHOLTZ, 2002).

Uma alternativa é a utilização de técnicas de biologia molecular, as quais independem de cultivo e possibilitam acessar uma maior diversidade de microrganismos no ambiente, sendo geralmente baseadas na extração de DNA e posterior reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando iniciadores previamente desenhados e sintetizados, permitindo o estudo de comunidades e identificação de microrganismos (RASTOGI e SANI, 2011).

Regiões do DNA ribossomal (rRNA) são as mais utilizadas como cronômetros moleculares, pois ocorrem em todos os organismos, com diferenças em suas sequências que permitem inferir relações filogenéticas entre os grupos. Os rRNA são pouco afetados pela transferência horizontal de genes, o que caracteriza a presença de sequências conservadas e permite o desenho de iniciadores e sondas de hibridização específicos, a fim de explorar taxonomicamente diferentes níveis de especificidade e descrever a filogenia da comunidade microbiana em diferentes habitats (ACINAS *et al.*, 2004).

O gene rRNA 16S é amplamente utilizado como marcador filogenético bacteriano, pois intercala regiões conservadas e variáveis, está presente em todas as bactérias, além de permitir a identificação de microrganismos pela presença de bancos de dados *online*, os quais permitem comparar as sequências e realizar afiliações filogenéticas. Outro ponto importante é o fato do gene rRNA 16S ter baixos índices de mutação por influências

ambientais, além de ser de fácil manipulação e possuir tamanho suficiente para ser utilizado em inferências filogenéticas (ACINAS *et al.*, 2004).

Já para fungos, a região do rRNA apresenta-se em um agrupamento gênico composto pelo gene 18S/SSU, o gene 5.8S e o gene 28S/LSU, respectivamente, separados por regiões espaçadoras denominadas ITS I e ITS II. A região ITS é a mais utilizada em inferências filogenéticas pois, além de possuir uma alta variação interespecífica, é constituída por regiões alternadas de segmentos conservados, possui um grande número de cópias no genoma, as quais são relativamente curtas, facilitando sua amplificação, bem como, por ser a região do genoma fúngico com maior número de sequências depositadas em bancos de dados mundiais, permite a classificação filogenética da maioria das sequências. Desse modo, a região ITS é aplicada na classificação de organismos para discriminar gêneros e espécies que constituem relações filogenéticas mais próximas (LIMA, 2012).

Alternativamente as técnicas dependentes de cultivo, para o estudo da estrutura das comunidades microbianas em amostras ambientais tem-se utilizando as regiões do genoma bacteriano e fúngico destacados, técnicas de *fingerprint* tem sido empregadas, dentre as quais pode-se destacar a eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE). Essa técnica foi desenvolvida para detectar modificações de uma única base em DNA genômico, DNA clonal e DNA amplificado por PCR, sendo expandido seu uso para o estudo da organização da estrutura das comunidades microbianas em diferentes ambientes (MUYZER, DE WAAL e UITTERLINDEN, 1993).

A técnica da PCR-DGGE baseia-se na amplificação, por PCR, de fragmentos de DNA de fita dupla com mesmo tamanho, os quais são obtidos a partir da utilização de iniciadores específicos para a região de interesse. Embora do mesmo tamanho, a sequência de nucleotídeos dos organismos avaliados apresenta diferenças na sua composição. Estes fragmentos são submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente de agentes desnaturantes uréia e formamida (FAKRUDDIN e



MANNAN, 2013). Na separação das fitas de DNA no gradiente desnaturante, os fragmentos irão migrar diferencialmente, de acordo com o seu teor de G+C, formando um padrão de bandas distinto quando houver diferença na estrutura da comunidade analisada (RASTOGI e SANI, 2011).

No entanto, fragmentos diferentes podem ter características similares de mobilidade no gel, podendo apresentar o mesmo teor de G+C em diferentes posições ao longo do fragmento de DNA e uma banda pode, não necessariamente, representar uma única espécie (GELSOMINO *et al.*, 1999). A PCR-DGGE permite detectar aproximadamente 50 % das variações de seqüências em fragmentos de DNA com até 500 pares de base (pb). No entanto, com a implementação nos iniciadores de um grampo de GC (*GCclamp*), impedindo a dissociação completa das duas fitas de DNA durante a eletroforese, a sensibilidade de detecção nas variações das seqüências aumentou significativamente (FAKRUDDIN e MANNAN, 2013).

Essa técnica mostra-se como uma ferramenta eficiente na detecção de mudanças na estrutura de comunidades microbianas em função de alterações ambientais causadas por práticas de manejo e/ou associadas à variabilidade de atributos mensurados nas amostras analisadas (FAKRUDDIN e MANNAN, 2013). Dessa forma, justifica-se a utilização desta técnica para avaliação da estrutura das comunidades bacterianas e fúngicas das amostras de solo das áreas de restinga do PAERV.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a estrutura das comunidades de bactérias e fungos do solo de áreas de restinga preservadas do Parque Estadual do Rio Vermelho, SC e relacioná-las com os atributos químicos do solo, dada a importância dos microrganismos para o estabelecimento e preservação de espécies vegetais nativas nesse ecossistema visto a sua importância ecológica e social.

### 2.2 Objetivos específicos

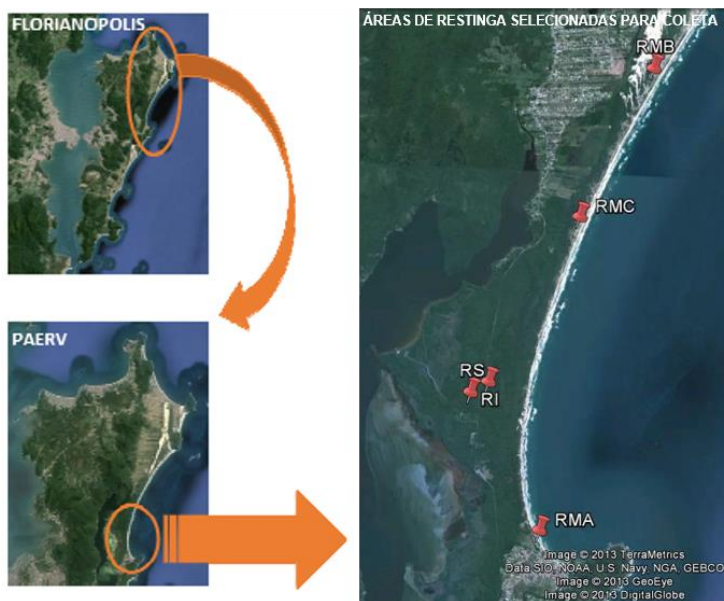
- Avaliar a estrutura da comunidade de bactérias do solo por PCR-DGGE;
- Avaliar a estrutura da comunidade fúngica do solo por PCR-DGGE;
- Comparar a estrutura das comunidades de bactérias e fungos do solo das áreas de restinga marinha, sujeita a inundação e seca;
- Avaliar a influência do *Pinus* sp. sobre a estrutura das comunidades do solo das áreas de restinga de RI *Pinus* e RS *Pinus*;
- Correlacionar a estrutura das comunidades microbianas com os atributos químicos do solo.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Seleção das áreas de restinga e amostragem

Para avaliar a estrutura das comunidades bacterianas e fúngicas do solo de áreas de restinga preservadas do PAERV, ou seja, sem a presença de *Pinus* sp., foram selecionadas duas áreas de restinga arbórea, uma que sofre inundações ocasionais (restinga sujeita a inundação - RI) e outra não inundável (restinga seca - RS) e uma área de restinga herbácea sob influência marinha (restinga marinha - RM), ou seja, uma área de sofre inundação eventuais ao longo do tempo (Figura 3).

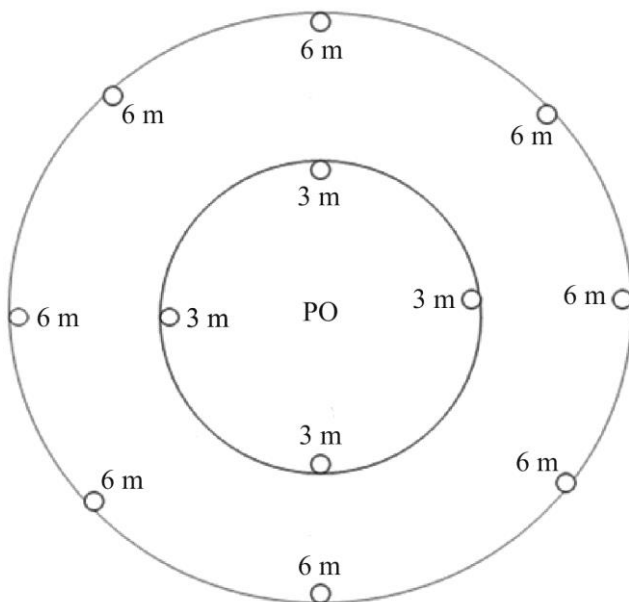


**Figura 3** – Seleção das áreas de restinga para coleta das amostras de solo no PAERV. RM – restinga marinha (A, B e C); RI – restinga sujeita a inundação; RS – restinga seca.

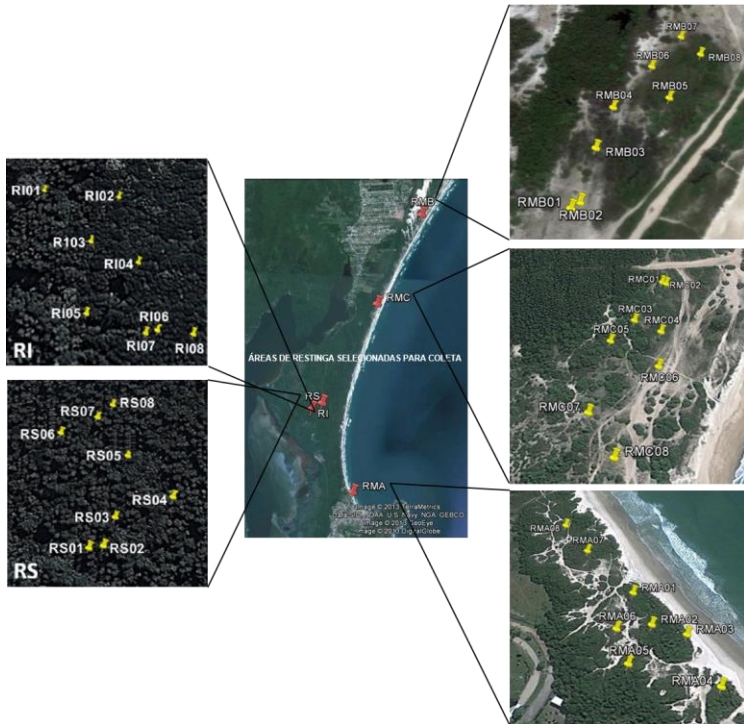
Em cada área de restinga foi estabelecido um grid de 100 x 100 m, com oito pontos amostrais georeferenciados e regularmente espaçados. De cada ponto coletou-se uma amostra composta de 12 sub-amostras (quatro sub-amostras coletadas em um raio de 3 m e oito sub-amostras em um raio de 6 m do ponto original) (Figura 4), totalizando 42 amostras de solo, pois foram selecionadas três áreas de RM (RMA, RMB e RMC), baseada na maior heterogeneidade dessa restinga, tanto pela diversidade de espécies vegetais, quanto pelo aporte nutricional fornecido pelo spray marinho (Figura 5), além de uma amostra da RI e uma amostra da RS sob influência do *Pinus* sp. como áreas referência (RI<sub>Pinus</sub> e RS<sub>Pinus</sub>, respectivamente). Não foram selecionadas três áreas de RI e de RS pelo fato de não haver áreas preservadas suficientes.

As amostras de solo foram coletadas com trado na camada de 0-10 cm, acondicionadas em sacos plásticos estéreis tipo Nasco® e mantidas em caixa de isopor contendo gelo durante o transporte, sendo posteriormente armazenadas a -80 °C para posteriores análises moleculares e a 4 °C para análises químicas.

Esta pesquisa está vinculada ao Projeto intitulado “*Avaliação da diversidade e seleção de rizóbio para leguminosas nativas do Parque Estadual do Rio Vermelho: Uma pesquisa para uso da simbiose nos viveiros da FATMA*”, coordenado pelo Professor Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares, aprovado junto ao Edital FAPESC nº 02/2012 - Valorização da Biodiversidade Catarinense: Unidades de Conversação. Programa Biodiversidade do Estado de Santa Catarina. Dessa forma, as análises químicas de solo utilizadas para correlação com as estruturas das comunidades bacterianas e fúngicas apresentadas nesse trabalho não foram desenvolvidas nessa etapa da pesquisa, sendo os dados cedidos pelo Prof. Cláudio Soares. Por esse motivo a metodologia de análise química do solo não foi descrita nesse trabalho, estando contemplada em Canei (2014).



**Figura 4** – Esquema representativo da forma de coleta das 12 sub-amostras de solo de cada ponto de coleta das áreas de restinga do PAERV, Florianópolis, SC. PO refere-se ao ponto original georeferenciado a partir do qual foram medidas as distâncias para coleta das sub-amostras, enquanto as distâncias em metros, representam a distância das sub-amostras em relação ao PO.



**Figura 5** – Pontos de coleta das amostras de solo nas áreas de restinga do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC. RM – restinga marinha (A, B e C); RI – restinga sujeita a inundação; RS – restinga seca. Os números referem-se aos pontos de coleta dentro de cada área.



## 3.2 Caracterização da estrutura das comunidades microbianas

### 3.2.1 Extração do DNA metagenômico

Para avaliar a estrutura das comunidades microbianas, o DNA metagenômico foi extraído utilizando-se o kit comercial “*Power Soil Isolation Kit*” (Mobio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA), de acordo com as instruções estabelecidas no protocolo do fabricante. A integridade do DNA extraído foi confirmada por eletroforese horizontal, em gel de agarose 1 % em tampão TAE 1X corados com Sybr Green (Life Technologies, São Paulo, Brasil) por 60 min, a 60 V. A aquisição das imagens dos géis foi feita em foto documentador ChemiDoc MP (Bio-Rad, California, USA).

### 3.2.2 PCR-DGGE

A análise da estrutura das comunidades de microrganismos do solo das áreas de restinga do PAERV foi feita por PCR-DGGE, pela amplificação de regiões específicas do genoma de bactérias e fungos.

A região V3 do gene rRNA 16S de Bacteria foi amplificada com os iniciadores universais para bactérias BAC338FGC (5' GCC CGC CGC GCG CGG CGG GCG GGG CGG GGG CAC GGA CTC CTA CGG GAG GCA GCA G 3') e UN518R (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3') (OVREÅS *et al.*, 1997). A amplificação foi feita em solução tampão para Taq DNA polimerase contendo 0,2 mM dNTPs, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U DNA polimerase Taq (Life Technologies, São Paulo, Brasil), 15 mM dos primers e 100 ng do DNA metagenômico. As condições de amplificação foram de 5 min a 95 °C; 30 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 55 °C e 1 min a 72 °C; e extensão final por 10 min a 72 °C em um termociclador Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha).

A comunidade de fungos foi avaliada a partir da amplificação, por *nested* PCR, da região ITS, primariamente com

os iniciadores ITS1-F-GC (5' TTC CGT AGG TGA ACC TGC GG 3') e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'), (Invitrogen Technologies made in Brazil) (WHITE *et al.*, 1990). A amplificação foi feita nas mesmas condições que para bactérias descrito acima. As condições de amplificação no termociclador foram 5 min a 94 °C; 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 55 °C e 30 s a 72 °C; e extensão final por 10 min a 72 °C em um termociclador Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Para a segunda reação de PCR foram utilizados os iniciadores ITS1-F-GC e ITS2R (5' GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC 3') (WHITE *et al.*, 1990). As condições de amplificação e as ciclagens de temperatura foram feitas de acordo com a primeira PCR para fungos.

A amplificação foi verificada em gel de eletroforese horizontal com 1 % de agarose, utilizando-se tampão TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA), depois de corado com “Sybr Green” (Life Technologies, São Paulo, Brasil), e a aquisição das imagens dos géis feita em foto documentador ChemiDoc MP (Bio-Rad, California, USA).

Os produtos amplificados, tanto para bactérias quanto para fungos, foram analisados através de eletroforese em gel com 8 % (m/V) de acrilamida:bisacrilamida (37,5: 1, m:m), contendo um gradiente de 25 a 65 % de formamida e uréia (OVREÅS *et al.*, 1997). A eletroforese foi realizada à 200 V e 60 °C constantes, por 4h e 30 min, utilizando-se um sistema “DCode” (BioRad, Hercules, CA, USA), e tampão TAE 1X. O DNA foi corado com Sybr Green (Life Technologies, São Paulo, Brasil) e a aquisição das imagens dos géis foi feita em foto documentador ChemiDoc MP (Bio-Rad, California, USA).

### 3.3 Análise estatísticas

Os perfis de amplicons das estruturas das comunidades bacterianas e fúngicas foram avaliados com o programa *Gel Compar II* “BioNumerics 7,5” (Applied Maths), a partir da análise de agrupamento hierárquico utilizando-se o índice de *Jaccard* e o modelo de agrupamento por UPGMA. Os perfis de

bandas também foram comparados em um espaço de ordenação em escala multidimensional (MDS), através do programa PRIMER 5 (PRIMER-E Ltda, 2001), utilizando o coeficiente de similaridade de Bray Curtis para avaliar a distância entre as amostras, comparando as distâncias com as respectivas (di)similaridades. A relação entre essas duas medidas foi avaliada por regressão linear, sendo a confiabilidade da regressão representada pelo “*stress*”. Para discriminar os grupos foram testadas as diferenças entre o valor médio de similaridade entre as amostras (*rank*) dentro dos grupos e entre os grupos, a partir da análise de similaridade (ANOSIM), a qual calcula um valor R com base na comparação dos grupos, sendo o R recalculado com base em permutações, permitindo determinar diferenças estatísticas entre os perfis de bandas.

Com o objetivo de correlacionar a variabilidade dos perfis de bandeamento de bactérias e fungos, com os atributos químicos dos solos de restinga, bem como com a variação espacial das áreas selecionadas para coleta das amostras de solo, foi realizada uma análise de escala multidimensional não-métrica (*Non-metric Multidimensional Scaling – NMDS*). O resultado (cálculo das coordenadas) foi utilizado para realizar a análise de componentes principais (PCA) através do programa CANOCO, versão 4.55 (TER BRAAK e SMILAUER, 1998).



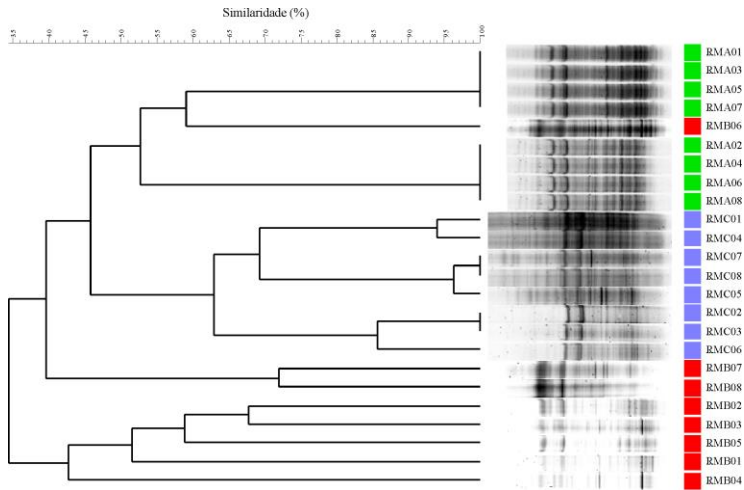
## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Comunidades bacterianas das áreas de restinga do PAERV**

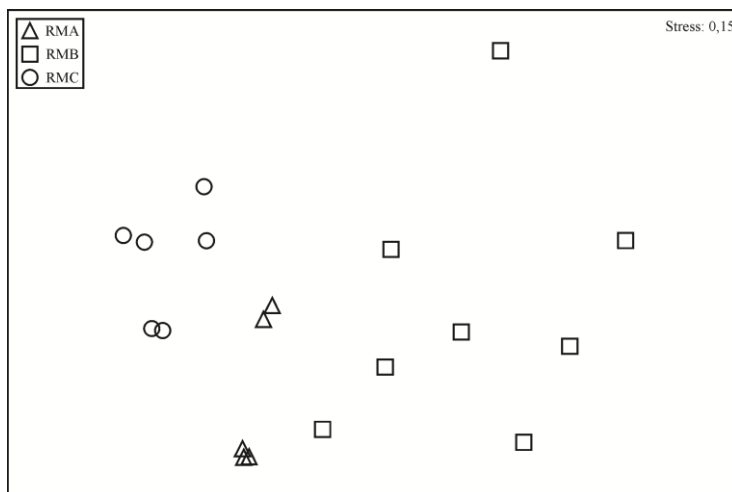
#### **4.1.1 Comunidades bacterianas das áreas de restinga marinha do PAERV**

A partir da análise de agrupamento hierárquico da estrutura das comunidades bacterianas das áreas de RM do PAERV, pode-se observar que as amostras agruparam por área (RMA, RMB e RMC), mas as áreas diferiram entre si (Figura 6). A estrutura das comunidades bacterianas foi mais similar entre as amostras da área RMC, seguida da área RMA, com algumas amostras apresentando 100 % de similaridade. Já a área RMB apresentou-se bastante heterogênea, com maior similaridade entre as amostras RMB07 e RMB08 (72 %).

Assim como na análise de agrupamento hierárquico, pode-se observar pela MDS (Figura 7), estruturas de comunidades bacterianas distintas entre as áreas de RM avaliadas, bem como uma maior similaridade entre as amostras da área RMC, seguida de RMA e uma maior heterogeneidade na estrutura da comunidade da área RMB. Comparando estatisticamente as estruturas das comunidades bacterianas nas áreas de RM avaliadas, pode-se observar que a área RMA não diferiu estatisticamente da área RMB, sendo que a área RMC diferiu estatisticamente das demais (Tabela 1).



**Figura 6** - Agrupamento hierárquico baseado nos perfis de amplicons do gene rRNA 16S de Bacteria das amostras de solo de restinga marinha (RM) do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC. RMA) área A; RMB) área B; RMC) área C. Os números referem-se aos pontos de coleta dentro de cada área.



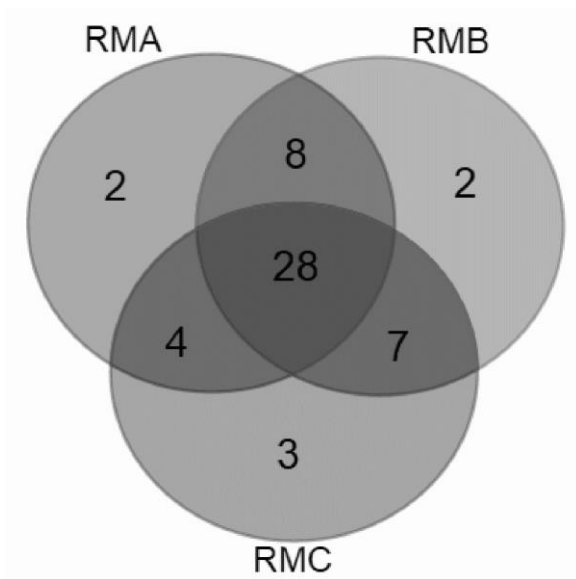
**Figura 7** – Análise de MDS baseada nos perfis de amplicons do gene rRNA 16S de Bactéria das amostras de solo de restinga marinha (RM) do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC. RMA) área A ( $\Delta$ ); RMB) área B ( $\square$ ); RMC) área C ( $\circ$ ).

**Tabela 1** - Resultado do teste de similaridade por *Pairwise* (pareamento) baseado nos perfis de amplicons do gene rRNA 16S de Bactéria das amostras de solo das áreas de restinga marinha (RMA, RMB e RMC) do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC

Comparações entre restingas marinhas	R estatístico
RMA, RMB	0,653
RMA, RMC	0,935*
RMB, RMC	0,748*

\* Comparações diferentes estatisticamente. Nível de significância para R global = 0,735;  $P < 0,01$ .

Apesar das diferenças entre as estruturas das comunidades bacterianas, grande parte dos amplicons obtidos (28) foram similares entre as áreas de RM, o que demonstra que as áreas são distintas, mas com a presença da maioria dos grupos similares. Apenas dois amplicons foram exclusivos das áreas RMA e RMB, e três da área RMC. O fato de RMA não ter diferido estatisticamente de RMB pode ser evidenciado pelo número de amplicons compartilhados apenas entre essas duas áreas (8) e o reduzido número de amplicons exclusivos de cada área. Em contrapartida, diferiram da área RMC, pela mesma apresentar um menor número de amplicons compartilhados com RMA (4) e RMB (7) e um maior número de amplicons exclusivos (Figura 8).



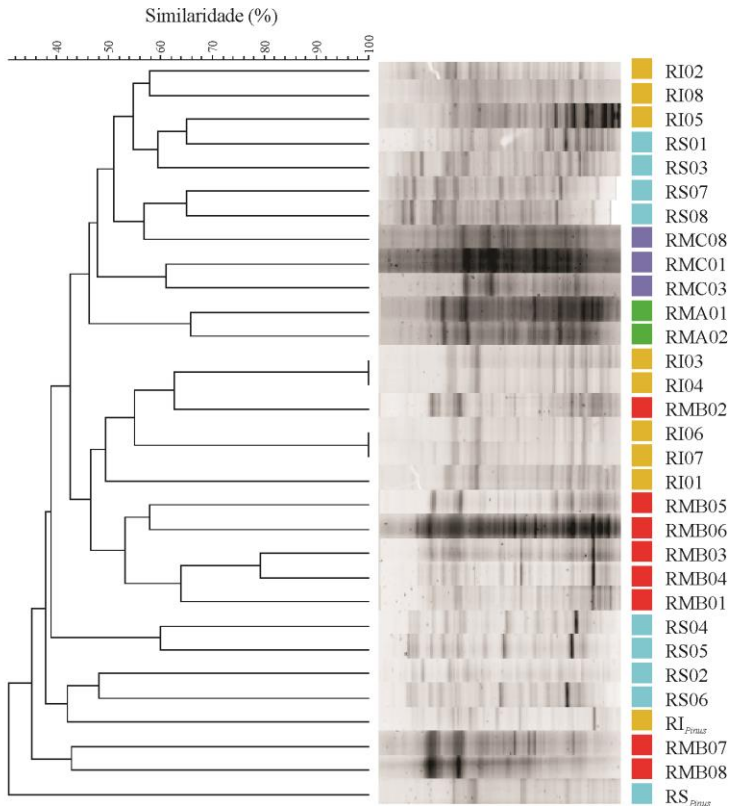
**Figura 8** - Diagrama de Venn obtido a partir dos perfis de amplicons do gene rRNA 16S de Bacteria das amostras de solo da restinga marinha (RM) do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC. RMA) área A; RMB) área B; RMC) área C.



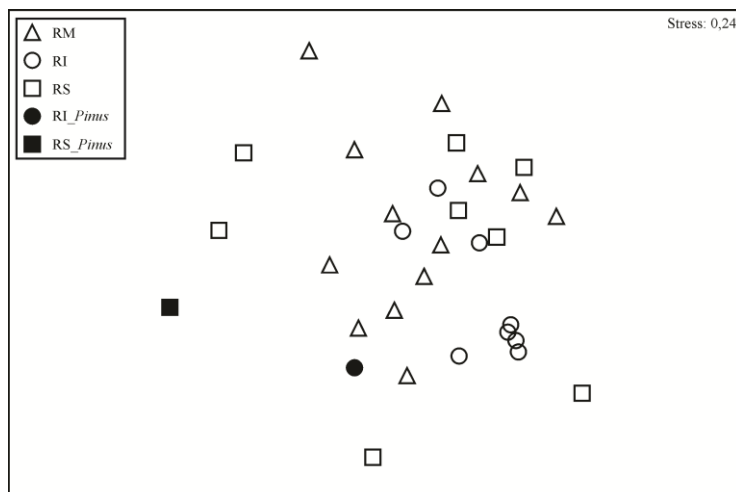
#### **4.1.2 Comparação entre as estruturas das comunidades bacterianas das áreas de restinga do PAERV**

Na análise comparativa entre a estrutura das comunidades bacterianas das áreas de RM, RI e RS, não foi possível observar um padrão de agrupamento por área de restinga, destacando-se a diferença da estrutura das comunidades das áreas de *Pinus* da RI e da RS, com relação as demais áreas de restinga. Maiores diferenças podem ser observadas na estrutura da comunidade de  $RS_{Pinus}$  (Figuras 9 e 10).

Tendo em vista o não agrupamento da estrutura das comunidades bacterianas por área de restinga analisada, estatisticamente, a partir da análise de ANOSIM, as únicas áreas que diferiram foram  $RS_{Pinus}$  das demais áreas analisadas, bem como  $RI_{Pinus}$  de RM (Tabela 2).



**Figura 9** - Agrupamento hierárquico baseado nos perfis de amplicons do gene rRNA 16S de Bacteria das amostras de solo de restinga do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC. RMA) área A restinga marinha; RMB) área B restinga marinha; RMC) área C restinga marinha; RI) restinga sujeita à inundação; RS) restinga seca. Os números referem-se aos pontos de coleta dentro de cada área, bem como *Pinus* refere-se as amostras de solo de restinga com presença dessa espécie vegetal.



**Figura 10** – Análise de MDS baseada nos perfis de amplicons do gene rRNA 16S de Bactéria das amostras de solo de restinga marinha (RM) (△), restinga sujeita à inundação (RI) (○), restinga seca (RS) (□) e restinga sujeita à inundação e restinga seca com presença de *Pinus* (RI<sub>Pinus</sub> (●) e RS<sub>Pinus</sub> (■)) do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC.

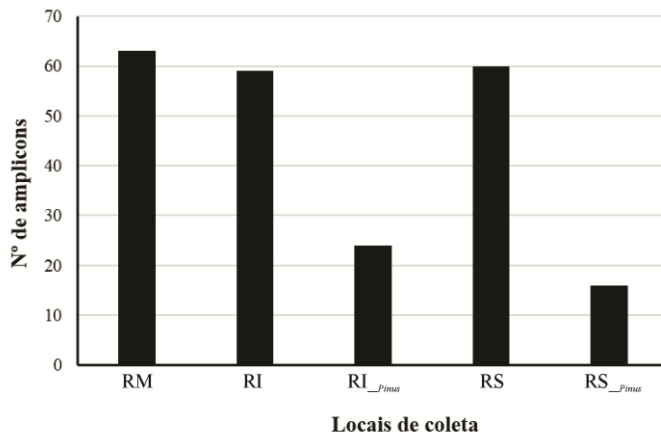
**Tabela 2** - Resultado do teste de similaridade por *Pairwise* (pareamento) baseado nos perfis de amplicons do gene rRNA 16S de Bacteria das amostras de solo de restinga marinha (RM), restinga sujeita à inundação (RI), restinga seca (RS) e restinga sujeita à inundação e restinga seca com presença de *Pinus* (RI<sub>Pinus</sub> e RS<sub>Pinus</sub>, respectivamente) do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC

Comparações entre restingas marinhas	R estatístico
RM, RI	0,219
RM, RS	0,269
RI, RS	0,346
RM, RI <sub>Pinus</sub>	0,425*
RM, RS <sub>Pinus</sub>	0,805*
RI, RI <sub>Pinus</sub>	0,407
RI, RS <sub>Pinus</sub>	1,000*
RS, RI <sub>Pinus</sub>	0,194
RS, RS <sub>Pinus</sub>	0,698*
RI <sub>Pinus</sub> , RS <sub>Pinus</sub>	1,000*

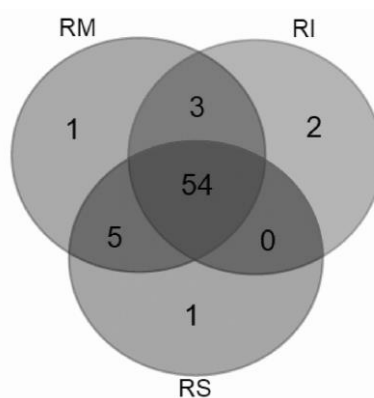
\* Comparações diferentes estatisticamente. Nível de significância para R global = 0,413;  $P < 0,01$ .

Um resultado importante diz respeito ao número de amplicons de cada área, tendo em vista o menor número detectado nas amostras de restinga com presença de *Pinus* (Figura 11). Estes resultados indicam que a presença de *Pinus* possui influência direta sobre a diversidade estrutural bacteriana em áreas de restinga, o que justifica a necessidade de revegetação dessas áreas com espécies nativas. O número de amplicons das áreas de restinga preservadas foi similar, assim como entre as áreas sob influência do *Pinus* (Figura 11).

Além de possuírem número de amplicons semelhantes, a maioria do amplicons detectados nas áreas de RM, RI e RS foram similares (54), o que demonstra não ocorrer influência significativa da maior proximidade do mar, presença de vegetação distinta (herbácea e arbórea), bem como dos parâmetros químicos do solo sobre a estrutura das comunidades bacterianas nas áreas avaliadas (Figura 12).

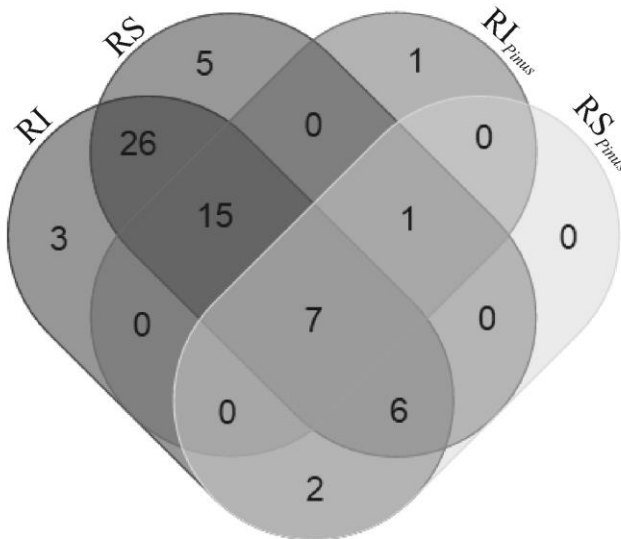


**Figura 11** – Número de amplicons do gene rRNA 16S de Bacteria das amostras de solo de restinga marinha (RM), restinga sujeita à inundação (RI), restinga seca (RS) e restinga sujeita à inundação e restinga seca com presença de *Pinus* (RI<sub>Pinus</sub> e RS<sub>Pinus</sub>) do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC.



**Figura 12** - Diagrama de Venn obtido a partir dos perfis de amplicons do gene rRNA 16S de Bacteria das amostras de solo de restinga marinha (RM), restinga sujeita à inundação (RI) e restinga seca (RS) do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC.

Quando comparados os amplicons presentes nas áreas de RI e RS preservadas com as áreas sob influência do *Pinus* sp.,  $RI_{Pinus}$  e  $RS_{Pinus}$ , é possível observar que o maior número de amplicons (26), são compartilhados entre as áreas preservadas, seguido dos amplicons compartilhados entre as áreas RI, RS e  $RI_{Pinus}$  (15). Apenas sete amplicons comuns foram verificados entre as quatro áreas (Figura 13). Estes resultados demonstram alterações na diversidade estrutural e possíveis alterações funcionais nas áreas de restinga sob influência do *Pinus* sp., o que pode contribuir para o não reestabelecimento natural de espécies vegetais nativas nas áreas de restinga do PAERV.



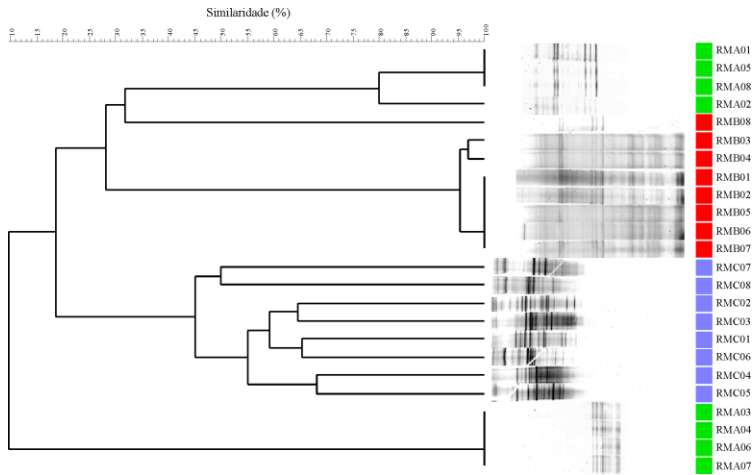
**Figura 13** - Diagrama de Venn obtido a partir dos perfis de amplicons do gene rRNA 16S de Bacteria das amostras de solo de restinga sujeita à inundação (RI), restinga seca (RS) e restinga sujeita à inundação e restinga seca com presença de *Pinus* ( $RI_{Pinus}$  e  $RS_{Pinus}$ ) do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC.

## **4.2 Comunidades fúngicas das áreas de restinga do PAERV**

### **4.2.1 Comunidades fúngicas das áreas de restinga marinha do PAERV**

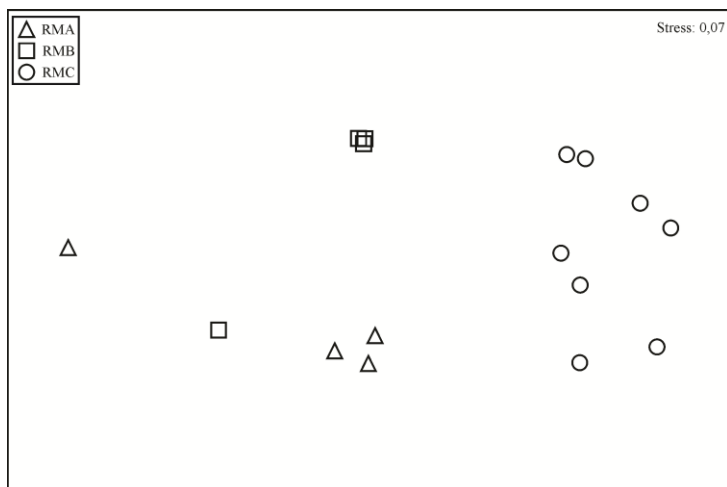
Avaliando o agrupamento hierárquico da estrutura das comunidades fúngicas das áreas de RM do PAERV, assim como a estrutura das comunidades bacterianas, observou-se o agrupamento das amostras de solo por área (RMA, RMB e RMC), diferindo entre as áreas (Figura 14). A estrutura das comunidades foi mais similar entre as amostras da área RMB, seguida por RMC. A área RMA apresentou uma menor similaridade entre as amostras pelo fato de ter formado dois grupos distintos, com apenas 10 % de similaridade entre eles, no entanto os grupos formados, quando avaliados separadamente, foram bastante similares (Figuras 14 e 15). A partir dos padrões de agrupamento obtidos, pelo teste de ANOSIM, semelhante aos resultados obtidos para bactérias, as áreas de RMA e RMB não diferiram estatisticamente entre si, enquanto RMC diferiu estatisticamente de RMA e RMB (Tabela 3).

As diferenças estatísticas observadas da área RMC quando comparada a RMA e RMB podem ser explicadas pelo número de amplicons exclusivos de RMC (24), enquanto RMA e RMB apresentaram apenas sete e 13 amplicons exclusivos, respectivamente. Já RMA e RMB não diferiram estatisticamente por apresentarem sete amplicons comuns e um menor número de amplicons exclusivos quando comparado com RMC. Contrariamente a estrutura das comunidades bacterianas, poucos amplicons foram comuns entre as áreas de RM (6), evidenciando a influência de alguns parâmetros, como proximidade do mar, tipo de vegetação e atributos químicos do solo sobre as comunidades fúngicas das áreas de RM (Figura 16).



**Figura 14** - Agrupamento hierárquico baseado nos perfis de amplicons da região ITS de fungos das amostras de solo de restinga marinha (RM) do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC. RMA) área A; RMB) área B; RMC) área C. Os números referem-se aos pontos de coleta dentro de cada área.



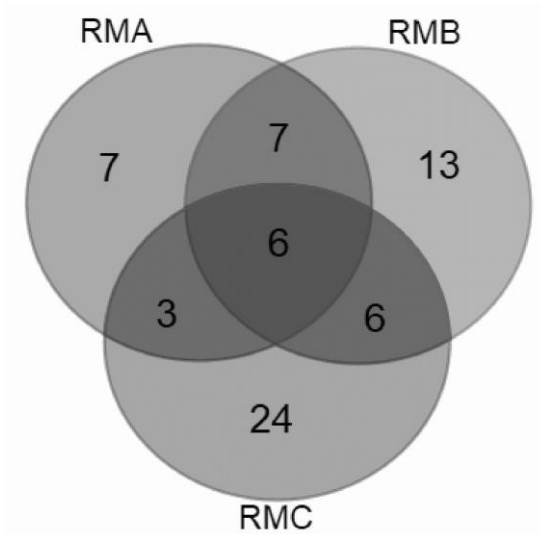


**Figura 15** – Análise de MDS baseada nos perfis de amplicons da região ITS de fungos das amostras de solo de restinga marinha (RM) do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC. RMA) área A ( $\Delta$ ); RMB) área B ( $\square$ ); RMC) área C ( $\circ$ ).

**Tabela 3** - Resultado do teste de similaridade por *Pairwise* (pareamento) baseado nos perfis de amplicons da região ITS de fungos das amostras de solo das áreas de restinga marinha (RMA, RMB e RMC)) do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC

Comparações entre restingas marinhas	R estatístico
RMA, RMB	0,602
RMA, RMC	0,887*
RMB, RMC	0,920*

\* Comparações diferentes estatisticamente. Nível de significância para R global = 0,810;  $P < 0,01$ .



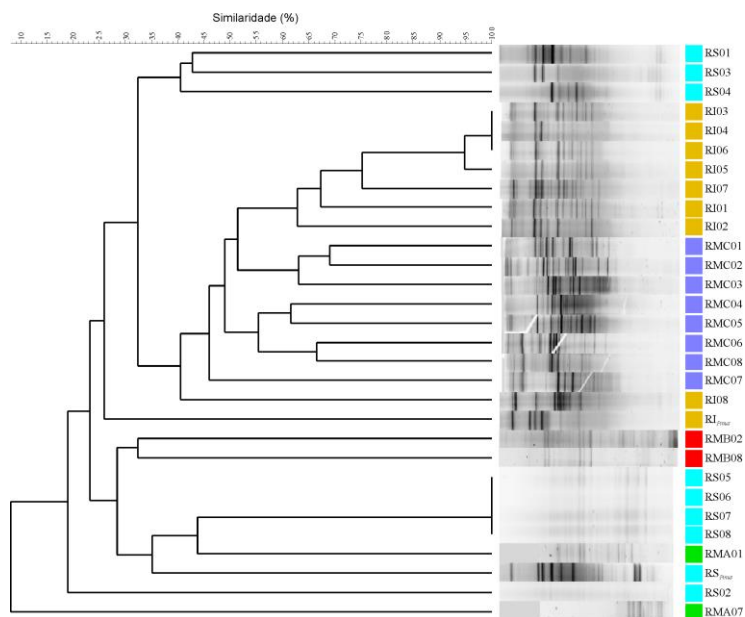
**Figura 16** - Diagrama de Venn obtido a partir dos perfis de amplicons da região ITS de fungos das amostras de solo da restinga marinha (RM) do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC. RMA) área A; RMB) área B; RMC) área C.

#### 4.2.2 Comparação entre as estruturas das comunidades fúngicas das áreas de restinga do PAERV

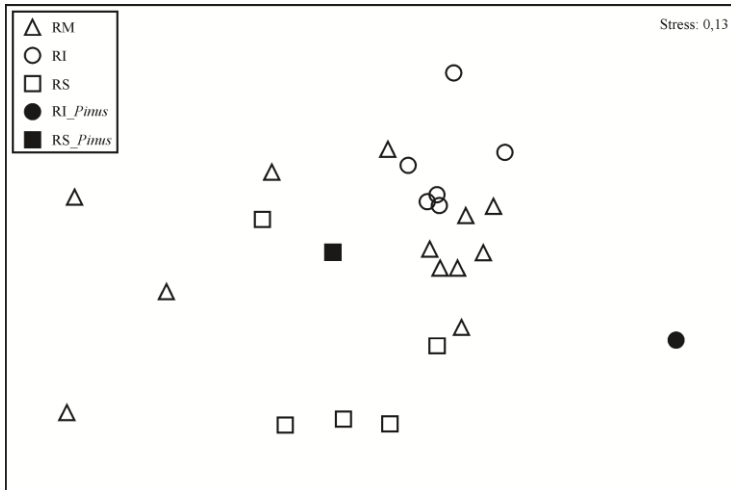
Na análise comparativa entre a estrutura das comunidades fúngicas das áreas de RM, RI e RS, é possível observar a tendência de agrupamento dos perfis de amplicons por área de restinga, condição não observada na análise da estrutura das comunidades bacterianas. Apesar do agrupamento por área de restinga, é possível observar nas amostras da RS, a formação de dois agrupamentos distintos, demonstrando a heterogeneidade dentro dessa área. Da mesma forma, comportamento semelhante pode ser observado para RM, a qual diferiu entre as três áreas (RMA, RMB e RMC). Também é possível observar que as comunidades das amostras de *Pinus* diferem das áreas sem a

presença dessa espécie vegetal, principalmente a amostra  $RI_{Pinus}$  (Figuras 17 e 18).

A partir da análise de ANOSIM, tendo em vista a heterogeneidade da comunidade fúngica da área de RM, a mesma não diferiu estatisticamente de RI e RS. Já RI diferiu estatisticamente das demais amostras analisadas, assim como RS, a qual não diferiu apenas da  $RS_{Pinus}$ . As áreas de RS e RI com presença de *Pinus* diferiram entre si (Tabela 4).



**Figura 17** - Agrupamento hierárquico baseado nos perfis de amplicons da região ITS de fungos das amostras de solo de restinga do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC. RMA) área A restinga marinha; RMB) área B restinga marinha; RMC) área C restinga marinha; RI) restinga sujeita à inundação; RS) restinga seca. Os números referem-se aos pontos de coleta dentro de cada área, bem como *Pinus* refere-se as amostras de solo de restinga com presença dessa espécie vegetal.



**Figura 18** – Análise de MDS baseada nos perfis de amplicons da região ITS de fungos das amostras de solo de restinga marinha (RM) (△), restinga sujeita à inundação (RI) (○), restinga seca (RS) (□) e restinga sujeita à inundação e restinga seca com presença de *Pinus* (RI<sub>Pinus</sub> (●) e RS<sub>Pinus</sub> (■)) do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC.

**Tabela 4** - Resultado do teste de similaridade por *Pairwise* (pareamento) baseado nos perfis de amplicons da região ITS de fungos das amostras de solo de restinga marinha (RM), restinga sujeita à inundação (RI), restinga seca (RS) e restinga sujeita à inundação e restinga seca com presença de *Pinus* (RI *Pinus* e RS *Pinus*, respectivamente) do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC

Comparações entre restingas marinhas	R estatístico
RM, RI	0,163
RM, RS	0,163
RI, RS	0,623*
RM, RI <sub><i>Pinus</i></sub>	0,510*
RM, RS <sub><i>Pinus</i></sub>	-0,091
RI, RI <sub><i>Pinus</i></sub>	1,000*
RI, RS <sub><i>Pinus</i></sub>	0,726*
RS, RI <sub><i>Pinus</i></sub>	1,000*
RS, RS <sub><i>Pinus</i></sub>	0,000
RI <sub><i>Pinus</i></sub> , RS <sub><i>Pinus</i></sub>	1,000*

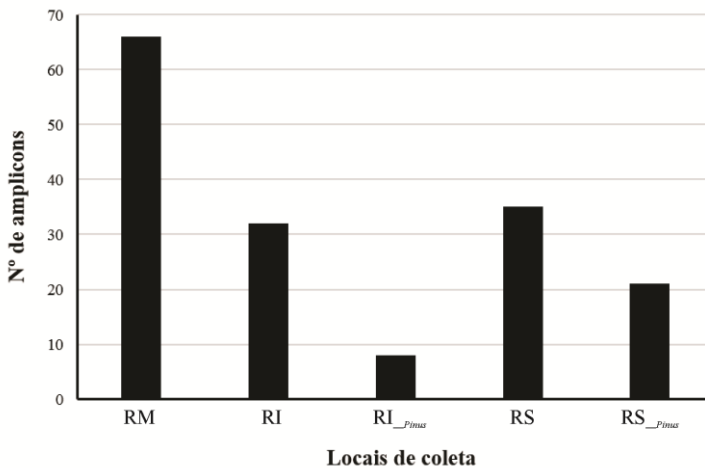
\* Comparações diferentes estatisticamente. Nível de significância para R global = 0,349;  $P < 0,01$ .

Apesar das áreas de RM não diferirem estatisticamente de RI e RS, é possível observar um maior número de amplicons na RM (68), indicando uma maior diversidade estrutural nesse ambiente. Em contrapartida, RI e RS apresentaram maior número de amplicons quando comparados as áreas com presença de *Pinus*, o que demonstra, assim como os resultados obtidos para bactérias, a seleção de fungos do solo na presença dessa espécie vegetal (Figura 19).

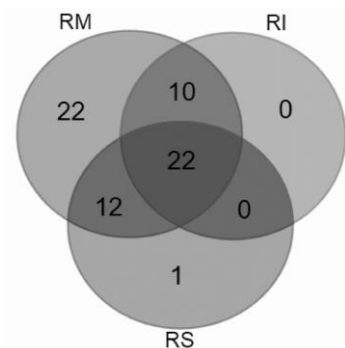
De uma forma geral, RM, RI e RS compartilham a maioria de seus amplicons (22). Na área de RM, um grande número de amplicons exclusivos também é observado (22), refletindo na maior diversidade estrutural observada nessa área. Com relação aos amplicons comuns entre cada uma das duas áreas, RM compartilha número semelhante com RI (10) e RS (12), enquanto RI e RS não compartilham amplicons (Figura 20).

Quando comparados os amplicons presentes nas áreas de RI e RS, com e sem a presença de *Pinus*, é possível observar que

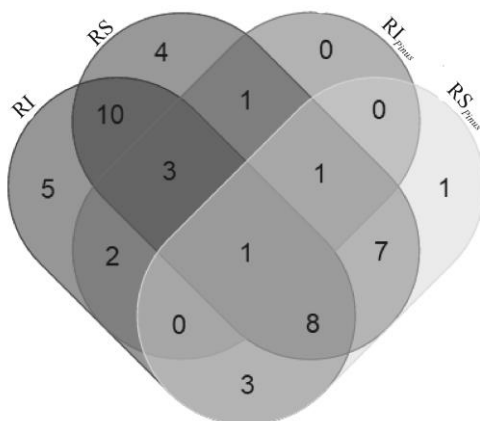
o maior número de amplicons (10), são compartilhados entre as áreas RI e RS, seguido dos amplicons compartilhados entre as áreas RI, RS e RS<sub>Pinus</sub> (8), sendo observado apenas um amplicon comum entre as quatro áreas (Figura 21). Estes resultados demonstram alterações na diversidade estrutural e possíveis alterações funcionais das comunidades fúngicas nas áreas de restinga contaminadas com *Pinus* sp.



**Figura 19** – Número de amplicons da região ITS de fungos das amostras de solo de restinga marinha (RM), restinga sujeita à inundação (RI), restinga seca (RS) e restinga sujeita à inundação e restinga seca com presença de *Pinus* (RI<sub>Pinus</sub> e RS<sub>Pinus</sub>) do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC.



**Figura 20** - Diagrama de Venn obtido a partir dos perfis de amplicons da região ITS de fungos das amostras de solo de restinga marinha (RM), restinga sujeita à inundação (RI) e restinga seca (RS) do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC.



**Figura 21** - Diagrama de Venn obtido a partir dos perfis de amplicons da região ITS de fungos das amostras de solo de restinga sujeita à inundação (RI), restinga seca (RS), restinga sujeita à inundação e restinga seca com presença de *Pinus* (RI<sub>Pinus</sub> e RS<sub>Pinus</sub>) do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC.

### **4.3 Correlação entre as comunidades microbianas e os atributos químicos das amostras de solo das áreas de restinga do PAERV**

Dentre as análises químicas do solo das áreas de restinga do PAERV, conforme trabalho desenvolvido por Canei (2014), pH e Al foram os atributos que diferiram nas três áreas de restinga avaliadas (RM, RI e RS). A acidez potencial (H+Al), Mg e carbono orgânico total (COT), não diferiram entre RM e RS, já K e Na não diferiram entre RM e RI (Tabela 5). Dessa forma, podemos observar uma heterogeneidade química das áreas de restinga avaliadas, o que pode ser explicado pela vegetação herbácea e arbórea que difere RM de RI e RS, respectivamente, bem como pelo efeito da inundação com água do mar na RM e RI.

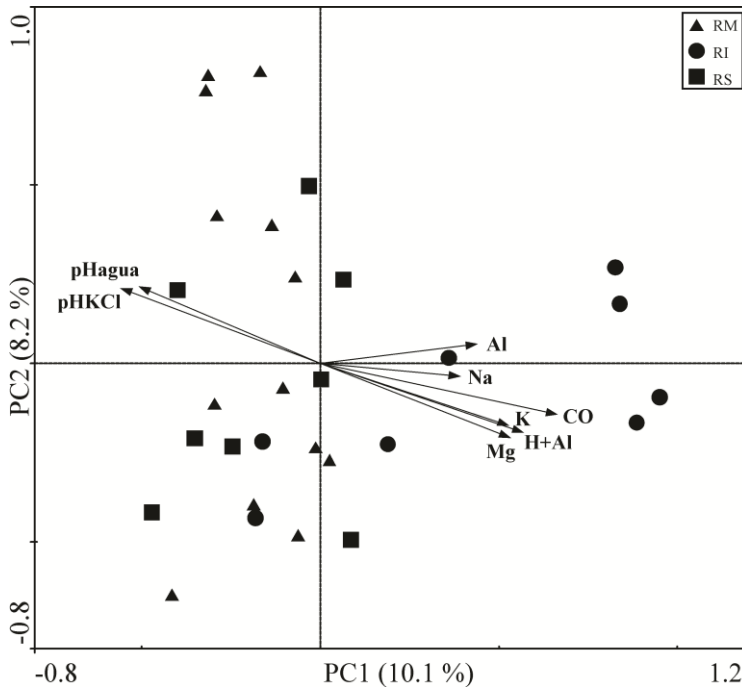
Quando os parâmetros químicos foram avaliados conjuntamente com os resultados da PCR-DGGE, tanto para bactérias (Figura 22) quanto para fungos (Figura 23) pela análise de componentes principais (PCA), pode-se observar que alguns parâmetros químicos foram determinantes na diferenciação da estrutura das comunidades microbianas entre as áreas de restinga do PAERV. Com relação a estrutura da comunidade bacteriana (figura 22), embora seja possível observar uma heterogeneidade entre os pontos de coleta dentro de cada área de restinga, podemos observar que o pH foi o atributo que teve maior contribuição para diferir as áreas de RM e RS da área de RI. Dos demais atributos químicos, podemos destacar a acidez potencial e o carbono orgânico total, os quais foram os principais atributos que contribuíram para separar RI de RM e RS. Assim, podemos observar que, embora a estrutura das comunidades bacterianas das áreas de restinga do PAERV não tenham diferido estatisticamente, os atributos químicos supracitados tiveram forte influência na diferenciação das áreas de RM e RS da área RI.



**Tabela 5** - Valores médios das análises químicas de solo das áreas de restinga marinha (RM), sujeita a inundação (RI) e seca (RS) do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC

Amostra	pH H <sub>2</sub> O	pH KCl	H+Al <sup>1</sup>	Al	K	Na	Mg	COT <sup>2</sup>
			cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	mg dm <sup>-3</sup>			g kg <sup>-1</sup>	
RM	5,23a <sup>3</sup>	4,53a	2,02b	6,21c	3,52a	12,20a	1,11b	7,89b
RI	3,87c	3,18c	33,87a	10,46a	4,87a	14,14a	1,94a	29,58a
RS	4,64b	3,83b	4,17b	7,87b	1,90b	8,30b	0,73b	13,90b

<sup>1</sup> Acidez potencial. <sup>2</sup> Carbono orgânico total. <sup>3</sup> Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem pelo teste de Tukey a 5 %. Fonte: CANEI (2014).



**Figura 22** - Análise de componentes principais associando o perfil de amplicons da PCR-DGGE de bactérias com os atributos químicos do solo das áreas de restinga do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC. COT) carbono orgânico; Al) alumínio; Mg) magnésio; H+Al) acidez potencial; Na) sódio; RM) restinga marinha; RI) restinga sujeita à inundação; RS) restinga seca.

Com rela o a estrutura das comunidades fúngicas (figura 23), comportamento semelhante a estrutura da comunidade bacteriana pode ser observado na PCA, onde o pH foi determinante para separar as áreas RM e RS da  rea RI, assim como acidez potencial e CO destacaram-se como atributos que diferiram RI de RM e RS. Uma diferença para a análise de PCA de bactérias foi o fato dos pontos de coleta dentro de cada área serem mais homog neos na análise de fungos, demonstrando que

as comunidades fúngicas dentro de cada área foram menos afetadas pelas variações dos atributos químicos.

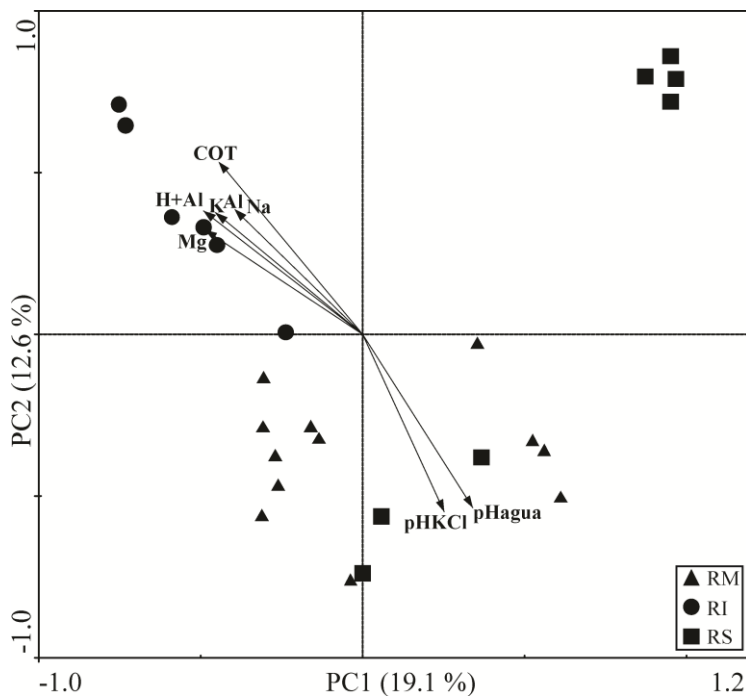


Figura 23 - Análise de componentes principais associando o perfil de amplicons da PCR-DGGE de fungos com os atributos químicos do solo das áreas de restinga do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC. COT) carbono orgânico; Al) alumínio; Mg) magnésio; H+Al) acidez potencial; Na) sódio; RM) restinga marinha; RI) restinga sujeita à inundação; RS) restinga seca.



## 5. DISCUSSÃO

A biota do solo compreende um vasto número de organismos que coabitam dinamicamente e desenvolvem parcial ou integralmente seus ciclos vitais no solo. Nesta dinâmica, onde os seres vivos, ambiente e solo afetam-se mutuamente e as condições são continuamente modificadas, a fauna, flora e microbiota são os principais grupos ecológicos. A microbiota representa a maior diversidade biológica e fisiológica do solo, sendo responsável por mais de 95 % da decomposição de resíduos orgânicos e pela ciclagem de nutrientes (BARETTA *et al.*, 2005). Tendo a microbiota do solo envolvimento direto em diversos processos neste hábitat, alterações nas condições químicas do solo podem limitar as comunidades microbianas, selecionando organismos específicos (CARDOSO, TSAI e NEVES, 1992; MOREIRA e SIQUEIRA, 2002), (SILVA, VIDAL-TORRADO e LAMBAIS, 2015).

Dentre os parâmetros químicos mais importantes na seleção de microrganismos do solo, podemos destacar as fontes de carbono, sendo nas áreas de restinga selecionadas no presente trabalho, a área de RM condicionada pelo spray marinho, o que caracteriza essa área como pobre nutricionalmente, conforme foi evidenciado a partir das análises químicas do solo dessa área. No caso da RI e RS o principal fornecimento de carbono é proveniente, principalmente, das plantas, como por exemplo, através da queda das folhas de suas copas, tendo um maior aporte nutricional, como foi evidenciado nas análises químicas do solo.

A cobertura vegetal influencia várias características do solo, incluindo sua textura, fertilidade e funcionamento biológico (AYRES *et al.*, 2009). Dessa forma, as espécies de plantas podem ser consideradas um dos principais determinantes da estrutura das comunidades microbianas no solo, uma vez que são elas as principais fornecedoras de carbono sob formas específicas à microbiota presente no ambiente (GARBEVA, VAN VEEN e VAN ELSAS, 2004). Vários artigos mostram que plantas com genótipos distintos podem apresentar comunidades microbianas distintas (ANDREOTE *et al.*, 2010).

Outro fator de modulação da comunidade microbiana pelas plantas envolve o efeito rizosférico, caracterizado pela liberação de uma grande variedade de compostos no solo como etileno, aminoácidos, ácidos orgânicos, vitaminas, polissacarídeos e enzimas. Esses compostos criam ambientes únicos para os microrganismos em associação com as raízes das plantas na rizosfera. Espécies distintas de bactérias, por exemplo, respondem diferentemente aos exsudatos das raízes de plantas de espécies diferentes; logo, diferentes composições desses exsudatos podem selecionar comunidades diferentes na rizosfera da planta. Por outro lado, as bactérias da rizosfera podem influenciar as plantas, de forma que uma ampla gama dessas bactérias serão capazes de promover crescimento das plantas através de sinais químicos, e produção de compostos, tais como auxinas, giberelinas ou glicolipídeos (BERTRAND *et al.*, 2001). Acredita-se que por meio da rizosfera as plantas podem recrutar a partir do solo, os grupos microbianos que serão benéficos ao seu desenvolvimento (MENDES *et al.*, 2011).

Este efeito rizosférico é importante para as áreas de restinga, por ser um ambiente com características tão peculiares, acredita-se que a microbiota possui papel primordial para o desenvolvimento das espécies vegetais nativas, sendo também de fundamental importância em programas de revegetação de áreas degradadas.

Embora não tenha sido caracterizada a vegetação nas áreas de restinga estudadas, o fato de ter sido trabalhado com uma área de restinga herbácea (RM) e duas áreas de restinga arbórea (RI e RS), as espécies vegetais distintas podem ter sido determinantes na diferenciação das estruturas das comunidades microbianas das áreas de restinga do PAERV. Este fato foi observado para a estrutura das comunidades fúngicas das áreas de restinga preservadas, as quais diferiram estatisticamente. Esta maior seletividade das comunidades fúngicas pode ser explicada pela maior dependência deste grupo de microrganismos por fontes de carbono específicas, enquanto as bactérias apresentam uma maior versatilidade metabólica, com potencial para explorar diferentes nichos (GLAZER e KIKAIIDO, 2007).

A composição de exsudatos da raiz é fortemente afetada pelo estágio de desenvolvimento da planta, que por sua vez pode afetar as comunidades microbianas presentes na rizosfera ao longo do tempo (YANG e CROWLEY, 2000). Utilizando a metodologia independente de cultivo PCR-TGGE, avaliou-se o grau de variação de populações bacterianas dominantes em relação ao tipo de solo (areia, silte e areia argilosa), tipo de planta (trevo, feijão e alfafa) e de estágio de desenvolvimento da planta (WIELAND, NEUMANN e BACKHAUS, 2001). Estes autores concluíram que a espécie vegetal teve maior efeito sobre a microbiota, indicando ser o fator mais importante e determinante na composição de comunidades microbianas.

Sendo assim, o fato do tipo de solo, planta ou outro efeito biótico ou abiótico ser primordial na estruturação das comunidades microbianas no solo pode ser explicado através das diferentes relações e interações microbianas envolvendo os microrganismos presentes no solo, a cobertura vegetal do ambiente e o tipo de solo (GARBEVA, VAN VEEN e VAN ELSAS, 2004). Dessa forma, o resultado destas interações são as diferentes estruturas de comunidades microbianas encontradas em solos distintos e sob diferentes ocupações e manejo.

Todos os aspectos levantados até o momento mostram que, das áreas de restinga estudadas, a RM, por possuir uma menor cobertura vegetal (fato observado no momento da coleta das amostras nas áreas) e ter um solo mais pobre nutricionalmente, em teoria, deveria apresentar uma menor diversidade microbiana estrutural quando comparada com RI e RS.

No entanto, principalmente para a comunidade fúngica, essa condição não foi observada, tendo a RM o maior número de amplicons, embora não tenha diferido das demais áreas de restinga. Esses resultados podem ser explicados pela constante condição de estresse a qual a microbiota presente nesse solo está exposta, ou seja, maior incidência de radiação solar, pela pequena cobertura vegetal, baixa fertilidade e constante contato com a água do mar. Essa condição não mantém o ambiente equilibrado, com perda de resiliência e, conforme alguns trabalhos, ambientes perturbados aumentam a diversidade microbiana do solo

momentaneamente, pois as comunidades estão em constante renovação em um curto espaço de tempo.

Contrariamente a isso, em ambientes com vegetação mais densa e ricos nutricionalmente, como é o caso das áreas de RI e RS, as comunidades não tendem a oscilar, a não ser pelo efeito da rizosfera, mantendo as comunidades mais equilibradas, as quais, por possuírem maior redundância tendem a possuir maior resiliência. O conceito de redundância de um ecossistema, tem sido referido à manutenção das funções bioquímicas no ecossistema, mesmo quando ocorre a substituição de um determinado organismo por outro (WALKER, 1992). Isso ocorre porque organismos funcionalmente semelhantes exibem várias formas de sobrevivência, adaptando-se a diferentes condições de crescimento e suportando adversidade de diferentes ambientes, habitats e nichos (PERRY *et al.*, 1989).

Além dos parâmetros condicionantes das comunidades microbianas do solo destacados anteriormente, o pH foi um fator importante na composição das comunidades, pois modula a disponibilidade de nutrientes no solo e influencia diretamente complexos enzimáticos usados na nutrição dos microrganismos do solo (LAUBER *et al.*, 2009). Em pH ácido ocorre a solubilização de alumínio e manganês que podem ser tóxicos às plantas e aos microrganismos, limitando a microbiota do solo. Esta característica observada na área RI pode ter sido um dos determinantes da menor diversidade microbiana estrutural nessa área de restinga, assim como a maior diversidade estrutural na área RM, pelo maior pH e menores concentrações de Al (PLATTE, 2002).

Cabe também salientar outro aspecto determinante para a seleção de microrganismos na área RI, a qual é caracterizada por períodos de inundação, os quais, sabidamente influenciam a microbiota do solo, principalmente pela geração de um ambiente anóxico, o qual selecionada grupos bacterianos e fúngicos específicos que toleram essa condição, reduzindo a diversidade estrutural de microrganismos nesses ambientes (REITH, DRAKE e KÜSEL, 2002).



Além de alterar a disponibilidade de nutrientes, a diminuição pH exerce efeitos sobre a microbiota do solo, destacando-se o aumento das populações de fungos em função da maior tolerância a acidez, com detrimento das populações de bactérias e actinomicetos (ROUSK, BROOKES e BÅÅTH, 2009), fato esse não observado no presente trabalho.

Torna-se inevitável comparar as estruturas das comunidades microbianas das áreas de RI e RS com e sem a presença de *Pinus* sp., tendo em vista a problemática do PAERV pela presença dessa espécie exótica. Podemos observar pela análise comparativa das comunidades microbianas, uma redução acentuada na diversidade estrutural de microrganismos nas áreas de RI e RS sob influência do *Pinus* sp. quando comparadas as áreas RI e RS sem a presença dessa espécie exótica. Esses resultados são preocupantes, pois a perda da diversidade de microrganismos pode ter influência direta no estabelecimento de espécies vegetais nativas das áreas de restinga do PAERV.

O grande poder adaptativo às condições variadas de solo e ambiente é primordial para o sucesso do estabelecimentos do *Pinus* spp., estando diretamente associado a simbiose com microrganismos, principalmente fungos micorrízicos (MAHMOUD *et al.*, 2003). A relação indissociável entre os fungos micorrízicos e as raízes das plantas facilita o estabelecimento vegetal em solos distróficos e pobres. As micorrizas aumentam a área de absorção radicular para captação de água e nutrientes e fortalece a resistência a toxidez de alumínio, além de diminuir a incidência de certas doenças fúngicas (FOELKEL, 2008).

A monocultura de *Pinus* sp. proporciona um ambiente uniforme, mas provoca várias alterações ecológicas nos ecossistemas e sobre a biodiversidade onde se estabelece, visto que altera a diversidade de substrato para a biota do solo, modificando, por sua vez, alguns atributos biológicos, como, por exemplo, C-biomassa e respiração microbiana do solo, além de alterar a densidade e diversidade da fauna edáfica (BARETTA *et al.*, 2005). A serrapilheira de suas florestas possuem altos teores de lignina, celulose, e baixa biodegradabilidade, o que confere

efeito seletivo ao número de decompositores. Entretanto, a disponibilidade de nutrientes, principalmente o nitrogênio, é menor em relação a outras espécies nativas, o que implica em decomposição mais lenta (LUGO, CUEVAS e SANCHEZ, 1990) quando comparada a outras espécies arbóreas nativas. O solo sob florestas de *Pinus* sp. apresenta alterações em relação aquelas mantidas sob o solo das florestas originais-naturais. Uma dessas alterações é a diminuição do pH (MAFRA *et al.*, 2008).

A redução do pH em solo de florestas de *Pinus* sp. pode ser atribuída às características de ciclagem de nutrientes e da decomposição das acículas. Portanto, a acidificação do solo destas florestas limita diversas culturas florestais, e sobretudo a atividade dos microrganismos do solo especialmente, bactérias e actinobactérias (PLATTE, 2002), resultando na decomposição lenta da serrapilheira e no aumento da taxa de absorção dos elementos mineralizados pelas raízes do *Pinus* sp., alterando a dinâmica de nutrientes do solo, diminuindo as concentrações de nitrogênio, fósforo, cálcio e magnésio disponíveis (MAFRA *et al.*, 2008).

Além da seletividade do *Pinus* sp. sobre a microbiota do solo a partir das características já destacadas, essa espécie vegetal também se caracteriza por produzir substâncias químicas alelopáticas capazes de inibir o desenvolvimento de outros vegetais. Em função dessa característica pode prejudicar o crescimento de plantas nativas e diminuir a diversidade em seus sub-bosques, bem como criar zonas de inibição, prejudicando a produção e culturas próximas às florestas plantadas. Compostos químicos extraídos de acículas de *Pinus* sp. apresentaram influência sobre a germinação de alface (FERREIRA, SOUZA e FARIA, 2007), causando redução significativa no desenvolvimento das raízes das plantas quando comparadas com a testemunha.

Em trabalho comparativo da diversidade da vegetação de regeneração e de microrganismos do solo em áreas de reflorestamento de *P. caribaea* e de florestas naturais no Sri Lanka, foi observado que a diversidade foi significativamente menor, tanto para a vegetação regenerativa quanto para os

microrganismos, das florestas plantadas de *P. caribaea*, sendo essa redução associada ao efeito alelopático das acículas dessa espécie de pinus (NISSANKA, MOHOTTI e WIJETUNGA, 2015).

Em um estudo para avaliar a diversidade de microrganismos do solo, em áreas de floresta ombrófila mista e reflorestada com *P. taeda* L., sob condições de inverno e verão e em três profundidades (serapilheira, zona de transição e solo), verificou-se que a diversidade microbiana, exceto de celulolíticos, independentemente da estação do ano, foram superiores na floresta natural (OSAKI, 2008).

Outra pesquisa para avaliar a diversidade das comunidades bacterianas e fúngicas da rizosfera de floresta plantada de *P. tabulaeformis* carr e floresta secundária natural, revelou que tanto as comunidades fúngicas quanto bacterianas foram mais diversificadas na floresta secundária natural, quando comparadas com a plantação de *P. tabulaeformis* (YU, WANG e TANG, 2013).

Dessa forma, torna-se evidente o efeito inibitório da presença de *Pinus* spp. sobre as comunidades microbianas do solo, o que pode interferir diretamente no equilíbrio ambiental dos ambientes de restinga, além de prejudicar o estabelecimento de espécies vegetais nativas e consequentemente a sucessão ecológicas nesses ambientes.



## 6. CONCLUSÕES

As comunidades bacterianas não diferiram entre as áreas de restinga, demonstrando sua maior versatilidade metabólica para explorar diferentes condições ambientais.

A estrutura das comunidades fúngicas apresentou-se mais específica do que a bacteriana, diferindo entre as áreas de restinga do PAERV, com exceção da área de RM, a qual não diferiu das demais.

A estrutura das comunidades microbianas de RI e RS quando comparadas com as comunidades das áreas sob influência de *Pinus* sp., demonstraram que a introdução dessa espécie exótica possui efeito seletivo sobre as comunidades microbianas do solo

O pH, carbono orgânico total e acidez potencial foram os atributos químicos com maior influência sobre as comunidades microbianas das áreas de restinga do PAERV.

Comunidades microbianas específicas foram selecionadas nas áreas de restinga preservadas do PAERV, sendo as mesmas influenciadas pela presença de *Pinus* sp., demonstrando a importância da remoção gradual dessa espécie alóctone para permitir o restabelecimento da microbiota do solo e consequentemente favorecer o crescimento de espécies vegetais nativas das áreas de restinga do PAERV.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pelo fato da redução da diversidade microbiana estrutural nas áreas de restinga do PAERV sob influência do *Pinus* sp., sugere-se a implementação de medidas de proteção e preservação dos fragmentos florestais nativos remanescentes, bem como a necessidade da remoção das espécies de *Pinus* das áreas para a recuperação posterior de sua floresta nativa.

Por outro lado, sabe-se que os microrganismos do solo são peça chave para a manutenção e equilíbrio de todas as relações de coexistência entre os aspectos bióticos e abióticos dentro de seu ecossistema. Para tal, a redução da sua diversidade microbiana no PAERV, ainda que seja de forma parcial, compromete gravemente a instalação e a sobrevivência de muitos outros seres vivos em seu domínio.

Este trabalho é um estudo pioneiro em solos de áreas de restingas no estado de Santa Catarina e um dos poucos no Brasil. No entanto, espera-se que outros trabalhos sejam realizados em solos destas áreas, visando uma melhor compreensão da complexidade das estruturas destas comunidades e, conseqüentemente, as suas relações ecossistêmicas, visando preservar os ambientes restinga, os quais possuem papéis ecológico e social essenciais.





## REFERÊNCIAS

ACINAS, S. G. et al. Divergence and Redundancy of 16S rRNA Sequences in Genomes with Multiple *rrn* Operons. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 9, p. 2629-2635, 2004. Disponível em: < <http://jb.asm.org/content/186/9/2629.abstract> >.

AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 1, p. 143-69, Mar 1995. ISSN 0146-0749 (Print). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ANDREOTE, F. D. et al. Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*). **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 97, n. 4, p. 389-99, 2010. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-010-9421-9> >.

ASSUMPÇÃO, J.; NASCIMENTO, M. T. Structure and floristic composition of four plant communities in a restinga vegetation in Grussaí/Iquipari, São João da Barra, RJ, Brazil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 14, n. 3, p. 301-315, 2000. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0102-33062000000300007&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0102-33062000000300007&lng=en&nrm=iso&tlng=pt) >.

AYRES, E. et al. Tree Species Traits Influence Soil Physical, Chemical, and Biological Properties in High Elevation Forests. **PLoS ONE**, v. 4, n. 6, p. 1-11 2009. ISSN 1932-6203 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0005964> >.

BARETTA, D. et al. Effects of native pasture burning and *Pinus* monoculture on changes in soil biological attributes on the Southern Plateau of Santa Catarina - Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n. 5, p. 715-724, 2005. Disponível em: <  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0100-06832005000500007&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0100-06832005000500007&lng=en&nrm=iso&tlng=pt) >.

BAUDOIN, E.; BENIZRI, E.; GUCKERT, A. Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, n. 9, p. 1183–1192, 2003. Disponível em: <  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00179-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00179-2) >.

BECHARA, F. C. **Restauração ecológica de restingas contaminadas por *Pinus* no Parque Florestal do Rio Vermelho, Florianópolis, SC**. 2003. 125 p. (Mestrado em Biologia Vegetal). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BERENHAUSER, H. Afforestation of coastal swamps and dunes at Rio Vermelho. **Revista Floresta**, v. 4, n. 2, p. 13-17, 2006-08-30 1972. Disponível em: <  
<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs/index.php/floresta/article/view/5761/0> >.

BERTRAND, H. et al. Isolation and identification of the most efficient plant growth-promot. **Biology and Fertility of Soils**, v. 33, n. 2, p. 152-156, 2001. Disponível em: <  
<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs003740000305> >.

BOURSCHEID, K.; REIS, A. Dinâmica da invasão de *Pinus elliottii* Engelm. em restinga sob processo de restauração ambiental no Parque Florestal do Rio Vermelho, Florianópolis, SC. **Biotemas**, v. 23, n. 2, p. 23-30, 2010. Disponível em: <  
<http://www.rasambiental.com.br/wp-content/uploads/2013/01/20110408102434.pdf> >.

CANEI, A. D. **Avaliação da diversidade de rizóbios de áreas de restinga da Unidade de Conservação Ambiental do Parque Estadual do Rio Vermelho, Florianópolis, SC.** 2014. 57 p. (Trabalho de Conclusão do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do Solo.** Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. 360 p.

CARUSO, M. M. L. **O desmatamento da ilha de Santa Catarina de 1500 aos dias atuais.** Florianópolis: UFSC, 1983. 158 p.

CONAMA. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução CONAMA n° 261, de 30 de junho de 1999,** 1999. Disponível em: <  
<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=260>  
>.

DOCHERTY, K. M.; GUTKNECHT, J. L. M. The role of environmental microorganisms in ecosystem responses to global change: current state of research and future outlooks - Springer. **Biogeochemistry**, v. 109, n. 1-3, p. 1-6, 2012. Disponível em: <  
<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10533-011-9614-y>  
>.

DOMINGOS, M. et al. Produção de serapilheira e retorno de nutrientes em um trecho de Mata Atlântica secundária, na Reserva Biológica de Paranapiacaba, SP. **Brazilian Journal of Botany**, v. 20, n. 1, p. 91-96, 1997. ISSN 0100-8404. Disponível em: <  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0100-84041997000100009&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0100-84041997000100009&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)  
>.

FAKRUDDIN, M.; MANNAN, K. S. B. Methods for analyzing diversity of microbial communities in natural environments. **Ceylon Journal of Science**, v. 42, n. 1, p. 19-33, 2013.

FALKENBERG, D. B. Aspectos da flora e da vegetação secundária da restinga de Santa Catarina, sul do Brasil. **INSULA Revista de Botânica**, v. 28, p. 1-30, 1999. Disponível em: < <https://periodicos.ufsc.br/index.php/insula/article/view/21771/19743> >.

FATMA. FUNDAÇÃO DO MEIO AMBIENTE. **Parque Estadual do Rio Vermelho**, 2015. Disponível em: < <http://www.fatma.sc.gov.br/conteudo/parque-estadual-do-rio-vermelho> >.

FERREIRA, F. A. C. **Projeto Parque Estadual do Rio Vermelho: Subsídios ao plano de manejo**. Florianópolis: Editora Insular, 2010. 196 p.

FERREIRA, M. C.; SOUZA, J. R. P. D.; FARIA, T. D. J. Allelopathy of plant extracts on germination and initial growth of beggartick (*Bidens pilosa* L.) and lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 4, p. 1054-1060, 2007. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-70542007000400017&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542007000400017&lng=en&nrm=iso&tlng=pt) < <http://www.scielo.br/pdf/cagro/v31n4/17.pdf> >.

FOELKEL, E. O conceito de espécies invasivas ou invasoras em relação ao *Pinus* **Pinusletter**, n. 4, 2008. Disponível em: < [http://www.celso-foelkel.com.br/pinus\\_04.html](http://www.celso-foelkel.com.br/pinus_04.html) >.

GARBEVA, P.; VAN VEEN, J. A.; VAN ELSAS, J. D. Microbial diversity in soil: selection microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, p. 243-70, 2004. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.012604.135455> >.

GELSOMINO, A. et al. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 38, n. 1-2, p. 1-15, 1999. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012\(99\)00054-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012(99)00054-8) >.

GLAZER, A. N.; NIKAIDO, H. **Microbial Biotechnology: Fundamental of Applied Microbiology**. California: University of California, 2007. 576 p.

GUEDES, F. B.; SEEHUSEN, S. E. **Pagamentos por serviços ambientais na Mata Atlântica: Lições aprendidas e desafios**. Brasília: MMA, 2011. 272 p.

GUSMÃO, E. D. et al. Morpho-anatomic studies of dicotyledons from Salvador - Bahia dunes: *Borreria cymosa* Chamo et Schl. and *Chiococca brachiata* R. et P. (Rubiaceae). **Acta Botânica Brasileira**, v. 6, n. 1, p. 79-98, 1992. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0102-33061992000100007&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0102-33061992000100007&lng=en&nrm=iso&tlng=pt) >.

HORN FILHO, N. O. Estágios de desenvolvimento costeiro no litoral da ilha de Santa Catarina, Santa Catarina, Brasil. **Revista Discente Expressões Geográficas**, n. 2, p. 70-83, 2006. Disponível em: < <http://www.geograficas.cfh.ufsc.br/arquivo/ed02/artigo05.pdf> >.

HUGENHOLTZ, P. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. **Genome Biology**, v. 3, n. 2, 2002-01-29 2002. ISSN 1465-6906. Disponível em: < <http://www.genomebiology.com/2002/3/2/reviews/0003> >.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Mapa de Biomas e de Vegetação**, 2004. Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomas.html.shtm> >. Acesso em: Acesso em: 28 de maio de 2015.

IVANAUSKAS, N. M.; ASSIS, M. C. Formações florestais brasileiras. In: MARTINS, S. V. (Ed.). **Ecologia de Florestas tropicais do Brasil**. Viçosa: Editora UFV, 2009. p.74-109.

JESUS, E. C. et al. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **ISME Journal**, v. 3, n. 10, p. 1004-1011, 2009. ISSN 1751-7362. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2009.98> >.

LAMBAIS, M. R. et al. Diversidade microbiana nos solos: Definindo novos paradigmas. In: VIDAL-TORRADO, P.; ALLEONI, L. R. F., et al (Ed.). **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa: Editora da Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v.4, 2005. p.43-84.

LAUBER, C. L. et al. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 15, p. 5111-20, 2009. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/aem.00335-09> >.

LIMA, N. C. D. J. **Relações filogenéticas em *Ganoderma* p. Karst. (basidiomycota) baseadas em sequências do dna ribossomal**. 2012. 69 p. (Mestrado em Biologia de Fungos). Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco.

LUGO, A. E.; CUEVAS, E.; SANCHEZ, M. J. Nutrients and mass in litter and top soil of ten tropical tree plantations. **Plant and Soil**, v. 125, p. 263-280, 1990.

MAFRA, Á. L. et al. Organic carbon and soil chemical attributes in forest areas. **Revista Árvore**, v. 32, n. 2, p. 217-224, 2008.

Disponível em: <

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-67622008000200004&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-67622008000200004&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)

<http://www.scielo.br/pdf/rarv/v32n2/a04v32n2.pdf> >.

MAGNAGO, L. F. S.; MARTINS, S. V.; PEREIRA, O. J. Floristic heterogeneity of phytocenoses restinga in Rio de Janeiro and Espírito Santo states, Brazil. **Revista Árvore**, v. 35, n. 2, p. 245-254, 2011. Disponível em: <

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0100-67622011000200009&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0100-67622011000200009&lng=en&nrm=iso&tlng=pt) >.

MAHMOUD, A. G. E. et al. Invasão de *Pinus elliottii* em um fragmento de Cerrado em Itirapina – SP. **Universidade Estadual de Campinas**, p. 11, 2003. Disponível em: <

<http://www2.ib.unicamp.br/profs/fsantos/relatorios/bt791r2a2003.pdf> >.

MEDEIROS, R. Evolução das tipologias e categorias de áreas protegidas no Brasil. **Revista Ambiente & Saúde**, v. 9, p. 41-64, 2005. Disponível em: <

<http://www.scielo.br/pdf/asoc/v9n1/a03v9n1.pdf> >.

MELO, A. T. D. O. **Fluxo gênico e estrutura genética espacial de *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae) em fragmentos florestais de Mata Atlântica**. 2012. 88 p. (Mestrado em Genético e Melhoramento de Plantas). Universidade Federal de Goiás, Goiás.

MENDES, R. et al. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. **Science**, v. 332, n. 6033, p. 1097-100, 2011. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1126/science.1203980> >.

MMA. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Florestas do Brasil em resumo**. Brasília: Serviço Florestal Brasileiro, 2009.

\_\_\_\_\_. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Mata Atlântica**, 2014. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/biomas/mata-atlantica> >. Acesso em: 15 de maio de 2015.

MOREIRA, F. M.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora da Universidade Federal de Lavras, 2002. 626 p.

MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 695-700, Mar 1993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

NAMARA, S. L.; MOREAU, M. S.; MORAES, M. E. Análise da paisagem com base na fragmentação - Caso APA Pratigi, Baixo Sul da Bahia, Brasil. **Revista Eletrônica do Prodema**, v. 6, n. 1, p. 53-67, 2011.

NIELSEN, U. N. et al. The influence of vegetation type, soil properties and precipitation on the composition of soil mite and microbial communities at the landscape scale. **Journal of Biogeography**, v. 37, n. 7, p. 1317-1328, 2010. ISSN 1365-2699. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2699.2010.02281.x/pdf> >.



NISSANKA, S. P.; MOHOTTI, K. M.; WIJETUNGA, A. S. T. B. Alleopathic influences of *Pinus caribea* on vegetation regeneration and soil biodiversity. 2015. Disponível em: < [http://www.regional.org.au/au/allelopathy/2005/2/1/2415\\_nissankasp.htm](http://www.regional.org.au/au/allelopathy/2005/2/1/2415_nissankasp.htm) >.

OSAKI, F. **Distribuição espacial de microrganismos e fertilidade em solos de dois ecossistemas florestais: floresta ombrófila mista e povoamento florestal com *Pinus taeda* L. em Tijucas do Sul-PR.** 2008. 234 p. (Doutorado em Ciências Florestais). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

OVREÅS, L. et al. 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 Environmental Microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3367-3373, 1997. Disponível em: < <http://aem.asm.org/content/63/9/3367> >.

PERES, C. S. A previsão constitucional do bioma Mata Atlântica. **Revista Brasileira de Direito Constitucional**, n. 16, p. 109-119, 2010.

PERRY, D. A. et al. Bootstrapping in Ecosystems. **BioScience**, v. 39, n. 4, p. 230-237, 1989.

PLATTE, E. B. **Aplicação de lama de cal em solo de floresta de *Pinus taeda* e seus efeitos sobre a microbiota do solo e biodegradabilidade da serrapilheira.** 2002. 86 p. (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

PORTZ, L. et al. Dispersão de espécie exótica no Parque Nacional da Lagora do Peixe e seu entorno. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 1, p. 33-44, 2011. Disponível em: < <http://www.revista.ufpe.br/rbgfe/index.php/revista/article/viewFile/171/152> >.

PRADO, F. B.; VASCONCELOS, F. C. W.; CHIODI, C. K. Regime jurídico da Mata Atlântica e o risco à sobrevivência in situ de espécies ameaçadas. **Ambiente & Sociedade**, v. 17, n. 2, p. 1-16, 2014.

PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA. **Lei nº 11.428 de 22 de dezembro de 2006**, Art. 2º, 2006. Disponível em: < [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2004-2006/2006/lei/111428.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2006/lei/111428.htm) >.

RASTOGI, G.; SANI, R. K. Molecular techniques to assess microbial community structure, function, and dynamics in the environment. In: AHMAD, I.; SUTRA, A., *et al* (Ed.). **Microbes ad Microbial technology**. California: Springer Science, 2011. p.29-57

REITH, F.; DRAKE, H. L.; KÜSEL, K. Anaerobic activities of bacteria and fungi in moderately acidic conifer and deciduous leaf litter. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 41, n. 1, p. 27-35, 2002.

ROUSK, J.; BROOKES, P. C.; BÅÅTH, E. Contrasting Soil pH Effects on Fungal and Bacterial Growth Suggest Functional Redundancy in Carbon Mineralization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 6, p. 1589-96, 2009. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/aem.02775-08> >.

SILVA, K. J.; VIDAL-TORRADO, P.; LAMBAIS, M. R. Bacterial and archaeal communities in bleached mottles of tropical podzols. **Microbial Ecology**, v. 69, n. 2, p. 372-82, 2015. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-014-0493-3> >.

SNUC. SISTEMA NACIONAL DE UNIDADES DE CONSERVAÇÃO DA NATUREZA. **Lei nº 9.985, de 18 de julho de 2000**, Art 225, 2000. Disponível em: < [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/19985.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/19985.htm) >.

TEDERSOO, L. et al. Global diversity and geography of soil fungi. **Science**, v. 346, n. 6213, p. 1078-1089, 2014-11-28 2014. Disponível em: < <http://www.sciencemag.org/content/346/6213/1256688.abstract> >.

TER BRAAK, C. J. F.; SMILAUER, P. **Canoco reference manual and user's guide to Canoco for Windos: software for canonical community ordination (version 4)**. New York: Microcomputer Power, 1998. 351 p.

VALDUGA, M. **Impactos dos plantios comerciais de *Pinus spp.* e *Eucalyptus spp.* sobre a biodiversidade continental do BRasil: revisão sistematizada e estudo de caso**. 2014. 109 p. (Doutorado em Ecologia e Conservação). Universidade Federal do Paraná, Paraná.

VITALI, M.; UHLIG, V. M. Unidades de Conservação de Santa Catarina. **Sustentabilidade em debate**, v. 1, p. 43-61, 2010. Disponível em: < <http://periodicos.unb.br/index.php/sust/article/view/729> >.

WALKER, B. H. Biodiversity and Ecological Redundancy. **Conservation Biology**, v. 6, n. 1, p. 18-23, 1992. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1523-1739.1992.610018.x/pdf> >.

WHITE, T. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H. J. J., et al (Ed.). **Book Protocols: A guide to methods and applications**. New York: Academic Press, 1990. p.315-322.

WIELAND, G.; NEUMANN, R.; BACKHAUS, H. Variation of microbial communities in soil, rhizosphere, and rhizoplane in response to crop species, soil type, and crop development.

**Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 12, p. 5849-54, 2001. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/aem.67.12.5849-5854.2001> >.

YANG, C. H.; CROWLEY, D. E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 345-51, 2000. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

YU, H.-X.; WANG, C.-Y.; TANG, M. Fungal and Bacterial Communities in the Rhizosphere of *Pinus tabulaeformis* Related to the Restoration of Plantations and Natural Secondary Forests in the Loess Plateau, Northwest China. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1-12, 2013. Disponível em: < <http://www.hindawi.com/journals/tswj/2013/606480/cta/> >.

ZILLER, S. R. **A estepe gramíneo-lenhosa no segundo planalto do Paraná: Diagnóstico ambiental com enfoque a contaminação biológica**. 2000. 242 p. (Doutorado em Ciências Ambientais). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.