

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

COMUNIDADE BACTERIANA DE UMA ÁREA DO BIOMA PAMPA

Rafael da Silveira Vargas

Porto Alegre

2014

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

COMUNIDADE BACTERIANA DE UMA ÁREA DO BIOMA PAMPA

Dissertação submetida ao Programa de Pós- Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Genética e Biologia Molecular**.

Prof. Dr. Luciano Kayser Vargas

Orientador

Porto Alegre, Março de 2014

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luciano Kayser Vargas pela dedicação, atenção nas horas de correções e sugestões para um melhor trabalho e principalmente pelos ensinamentos passados.

A minha co-orientadora Dr.^a Anelise Beneduzi, pela força, carinho, incentivo dado a mim para iniciar este novo projeto de vida e pelo esforço e compreensão nos ensinamentos das técnicas que utilizei neste trabalho.

Aos profissionais e estagiários da Fundação Estadual de Pesquisas Agropecuária (FEPAGRO/RS), em especial ao amigo e colega Bruno Lisboa pela ajuda e ensinamento dos experimentos. Aos colegas Bruna, Cássio, Silviane e Fernanda pelo companheirismo e força que me deram ao longo deste tempo.

À Renata Bataioli pela companhia, pelo trabalho árduo na coleta das amostras, nos isolamentos, nas risadas na hora de elaborar experimentos. Minha “orientanda” querida chegamos ao fim desse passo.

À Prof.^a Dr.^a Luciane Passaglia, pela oportunidade de fazer parte da sua equipe de pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular Vegetal, especialmente os colegas do Núcleo de Microbiologia Agrícola que mesmo não tendo muita convivência me auxiliaram e me ensinaram quando precisei principalmente ao Pedro Beschoren da Costa pelos ensinamentos, acompanhamentos e atenção prestados a mim durante minhas passagens pelo laboratório.

Aos novos colegas do Laboratório de Fitomicrobiologia da Souza Cruz pelo carinho e força dados, especialmente para Angela Redolfi na hora dos PCRs e discussões de metodologias, a Marcia Peripolli pela ajuda na procura de novas bibliografias e incentivo, a Priscila Cruz e Pâmela Lima, pelo carinho, força e principalmente incentivo para seguir adiante.

Ao meu pai Sérgio Aírto Vargas pela força, carinho, incentivo e por acreditar que seria capaz de finalizar esta etapa.

A minha mãe Janete da Silveira e minha irmã Laura da Silveira Vargas que mesmo tendo esta distância de vocês, sempre me apoiaram e ouviram meus desabafos.

Ao meu amigo e companheiro Leandro Almeida por todas as vezes que o incomodei, desabafei e me passastes novas forças ... você sempre esteve lá.

Aos amigos e amigas que por muitas vezes deixei de vê-los, de passear e curtir com vocês, estavam sempre ao meu lado, principalmente a Natasha Timmen, Barbara Machado e Carla dos Anjos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, por me acolherem e passarem seus conhecimentos, em especial ao Elmo pela atenção prestados toda a vez que compareci a secretaria.

À FEPAGRO, pela acolhida e disponibilização dos laboratórios para a realização do projeto.

Meu muito Obrigado a Todos Vocês!!!!!!

Abreviaturas

ADP	<i>Adenosine diphosphate</i> (difosfato de adenosina)
AIA	ácido Indol Acético
Al	alumínio
Al ³⁺	íon alumínio
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> (trifosfato de adenosina)
Ca	cálcio
Ca ³⁺	íon cálcio
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucléico)
FBN	fixação biológica de nitrogênio
Fe	ferro
Fe ³⁺	íon férrico
H ₂	hidrogênio
HPO ₄ ⁻	ortofosfatobiácido
HPO ₄ ²⁻	ortofosfato monoácido
N	nitrogênio
N ₂	nitrogênio atmosférico
NH ₃	amônia
P	fósforo
Pi	Fósforo inorganico
PCR	<i>polymerase Chain Reaction</i> (reação de polimerização em cadeia)
PGPR	<i>Plant growth promoting rhizobacteria</i> (rizobactéria promotora de crescimento vegetal)
pH	Potencial hidrogeniônico
RFLP	<i>Restriction fragmente lenght polymorphism</i> (polimorfismo dos fragmentos de restrição)
RS	Rio Grande do Sul

Sumário

Agradecimentos	3
Abreviaturas	5
Resumo	7
Abstract	8
1- Introdução	9
1.1- Bioma Pampa	10
1.2- A importância dos microrganismos	11
1.3- Indicadores Bioquímicos do solo.....	12
1.4- O acesso a diversidade bacteriana	14
2- Objetivos	16
3- Capítulo I	17
4- Conclusões Gerais	45
5- Referências Bibliográficas	46

Resumo

As pastagens naturais do Bioma Pampa têm sido tipicamente utilizadas em sistemas extensivos de criação de bovinos de corte, com pouco ou nenhum aporte de insumos externos. Em ambientes naturais ou com pouca intervenção antrópica, como os sistemas pastoris tradicionais do Bioma Pampa, a microbiota do solo assume um papel no funcionamento do ecossistema. A presente pesquisa teve como objetivo avaliar o impacto de diferentes pressões de pastejo sobre a atividade microbiana e a diversidade de bactérias do solo. Foi avaliado um experimento de longa duração, localizado em Eldorado do Sul, Brasil, avaliando-se três níveis de pressão de pastejo: alta pressão de pastejo (HP), com 4% de oferta de forragem (OF); pressão de pastejo moderada (MP), com 12% de OF e baixa pressão de pastejo (LP), com 16% de OF. Foram avaliadas ainda duas áreas de referência, sendo uma área de vegetação nativa nunca pastejada (NG) e outra de vegetação regenerada após dois anos de pastejo (RG). As amostras de solo foram avaliadas quanto à biomassa microbiana, atividades de β -glucosidase, arilsulfatase e urease, adotados como indicadores bioquímicos de qualidade do solo. Avaliou-se ainda a estrutura da comunidade bacteriana e da população de bactérias diazotróficas por meio de RFLP dos genes 16S rRNA e o nifH, respectivamente. A diversidade de bactérias diazotróficas foi avaliada por meio de sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. A presença de animais em pastejo favoreceu a comunidade microbiana do solo, de modo que a média geométrica geral dos atributos bioquímicos foi significativamente maior nos tratamentos com maior intensidade de pastejo, MP e HP. As estruturas da comunidade bacteriana e das populações de diazotróficos foram alteradas pelos diferentes manejos da pastagem, observando-se uma maior diversidade de bactérias diazotróficas culturáveis no tratamento LP. Considerando-se o conjunto das características bioquímicas e microbiológicas avaliadas no presente trabalho e o histórico da área, a adoção do tratamento MP parece o mais adequado visando à produção animal e à conservação do Bioma Pampa.

Abstract

The grasslands of the Pampa biome have been typically used in extensive breeding systems of beef cattle, with little or no contribution of external inputs. In natural environments or with little human intervention, such as traditional grazing systems of the Pampa biome, the soil microbiota plays a role in the ecosystem functioning. This study aimed to evaluate the impact of different grazing pressures on the activity and diversity of soil bacteria. We performed one long-term experiment in Eldorado do Sul, Brazil, which assessed three levels of grazing pressure: high grazing pressure (HP), with 4% herbage allowance (HA); moderate grazing pressure (MP), with 12% HA; and low grazing pressure (LP), with 16% HA. Two reference areas were also assessed, an area of never-grazed native vegetation (NG) and an area of regenerated vegetation after two years of grazing (RG). Soil samples were evaluated for microbial biomass; β -glucosidase, arylsulfatase and urease activities; and biochemical indicators of soil quality. The structure of the bacterial community and the population of diazotrophic bacteria were also evaluated by RFLP of the 16S rRNA and *nifH* genes, respectively. The diversity of diazotrophic bacteria was assessed by partial sequencing of the 16S rRNA gene. The presence of grazing animals favored the soil microbial community, and consequently, the overall geometric mean of the biochemical characteristics was significantly higher in MP and HP. The structures of the bacterial community and the populations of diazotrophic bacteria were changed by the different grazing managements, with a greater diversity of culturable diazotrophic bacteria observed in the LP treatment. Considering all the biochemical and microbiological characteristics evaluated in this study and the history of the area, adoption of the MP treatment seems the most appropriate for animal production and conservation of the Pampa biome.

1- Introdução

Os biomas podem ser classificados de várias maneiras, no entanto, existe um consenso entre os pesquisadores quanto aos principais biomas do mundo: tundra, taiga, florestas temperadas, florestas tropicais, campos e desertos (Santos et. al., 2009). No Brasil, por apresentar uma variabilidade climática, pode-se encontrar diferentes biomas. Segundo a classificação oficial da vegetação do Brasil pelo IBGE (2004), o país possui seis biomas terrestres: Amazônia, Mata Atlântica, Caatinga, Cerrado, Pantanal e Pampa ou Campos Sulinos (Carvalho et al., 2006), representados na Figura 1.



Fig. 1. Localização dos Diferentes Biomas (IBGE 2004)

O bioma Pampa tem sido utilizado para a produção agrícola, gerando impactos na biodiversidade deste sistema, este sendo responsável pela perda ou aumento do conteúdo de carbono orgânico no solo, afetando assim diretamente a diversidade microbiana deste solo. Visando uma produtividade agrícola sem muitos impactos, a intensidade de pastejo e o manejo dos solos são muito explorados, pois o comportamento da matéria orgânica do

solo sob um determinado sistema de manejo e a caracterização bacteriana presente neste solo, podem ser utilizados como ferramentas para determinar a qualidade dos mesmos.

1.1- Bioma Pampa

Os Campos Sulinos (ou Pampa) existem no Brasil mais precisamente no Rio Grande do Sul abrangendo uma área de 176. 496 km², ocupando 63% de seu território e 2,07% do território nacional. O Bioma Pampa, segundo o IBGE 2004, é uma reunião de formações ecológicas que se inter cruzam em uma formação ecopaisagística, com intenso tráfego de matéria, energia e vida entre os campos, matas ciliares, capões de mato e matas de encostas (Pillar et al., 1999).

Segundo Berreta (2001), a palavra campos refere-se a um tipo de vegetação composta por gramíneas e outras herbáceas, classificado como estepe no sistema fitogeográfico internacional e reconhecido como um bioma rico em biodiversidade.

A região em que se encontra o Rio Grande do Sul era formada por uma paisagem dominada por planícies, com algumas ondulações e lagos de baixa profundidade e extensão, configurando assim um refúgio à vida local, estes separados por planícies com pouca vegetação (Holzs, 1999). Essas paisagens foram substituídas por sedimentos de origem eólica, devido às mudanças bruscas influenciadas, principalmente, pelos movimentos tectônicos, vulcanismo de fissuras e ao aquecimento climático, dando, assim, a característica de paisagens planas (Pillar et al., 1999).

Neste bioma as pastagens naturais apresentam algumas singularidades importantes como à convivência mútua de espécies vegetais de rotas metabólicas C3 e C4 (Trindade, 2011; Boldrini, 2007) e a presença de plantas com hábitos de crescimento e resposta de resistência ao pastejo diferenciada (Trindade, 2011).

A produção pecuária é uma das principais atividades econômicas do Rio Grande do Sul e suas pastagens naturais representam a base da alimentação para a produção animal. As comunidades vegetais existentes neste Bioma encontram-se em contínuo processo de seleção natural e adaptação, devido a ações de manejo impostas pelo homem como subdivisão de áreas, carga animal, sistemas de pastejo, fertilização, queima e preparo de solo. Essas intervenções resultam em modificações no equilíbrio biológico do sistema,

alterando sua composição botânica e potencial produtivo de forma benéfica ou prejudicial (Carvalho et al., 2006; Millot et al., 1987).

O Bioma Pampa é um Bioma negligenciado, sendo o que menos recebe atenção das autoridades. Em estudos realizados no Brasil (Carvalho et al., 2006; Bilenca & Miñarro, 2004) foi constatado que dois fenômenos são preocupantes e ameaçadores a este importante recurso natural. O primeiro é a expansão da fronteira agrícola, representada, principalmente, pelo cultivo de soja, pelo reflorestamento e o plantio de pastagem (Carvalho et al., 2006). O segundo é o excesso de animais empregado no manejo das pastagens naturais (Carvalho et al., 2006). O preparo do solo e o pisoteio animal influenciam as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, podendo afetar o sistema radicular e a produção das culturas (Silva et. al., 1999; Bassani, 1996). A compactação do solo causa um aumento da resistência à penetração no solo e redução da porosidade total, da permeabilidade e da infiltração de água, resultantes de cargas aplicadas na superfície do solo (Silva et. al. 1999; Soane & Ouwerkerk, 1994). As consequências da degradação dos campos naturais e do Bioma Pampa em geral são: fragmentação da paisagem, perda de biodiversidade, erosão dos solos, invasão biológica, poluição das águas e degradação dos solos.

O bioma Pampa já apresenta passivos ambientais que, pela difícil reversibilidade, são considerados graves, tais como a arenização de extensas áreas, a alteração da fauna e flora nativas pela invasão de espécies exóticas e a supressão de extensas áreas com ecossistemas nativos (campos, banhados e matas) para uso agropecuário

1.2 Importância dos microrganismos

Apesar de não os vemos, os microrganismos constituem a grande maioria dos organismos no planeta (Whitman et al. 1998). Esses estão intimamente envolvidos nos ciclos biogeoquímicos e, em muitas circunstâncias, são os únicos agentes biológicos capazes de regenerar formas dos elementos assimiláveis por outros organismos, especialmente plantas, pois incorporam N por meio da fixação biológica e produzem e liberam substâncias reguladoras do crescimento vegetal, as quais contribuem para melhorar a nutrição mineral e utilização de água pelas plantas (Melloni R. et al. 2004, Bazzicalupo & Okon, 2000, Madigan et al. 2000).

Segundo Silveira et. al. (2005) e Grisi, (1995), que destacam a importância dos microrganismos e seus processos no funcionamento e equilíbrio de ecossistemas estão entre os atributos microbiológicos e bioquímicos que apresentam um grande potencial de utilização como indicadores sensíveis do estresse ecológico destacando-se a densidade total de bactérias, fungos, solubilizadores de fosfato, biomassa microbiana e atividade de microrganismos heterotróficos. A biomassa microbiana do solo é definida como a parte viva da matéria orgânica e além de armazenadora de nutrientes, pode servir como um indicador rápido de mudanças no solo, revelando a sensibilidade da microbiota a interferências no sistema (Grisi, 1995)

Os microrganismos presentes no solo são responsáveis por inúmeras transformações na fertilidade do solo, tais como: decomposição e síntese da matéria orgânica, mineralização e imobilização de nutrientes, FBN, entre outros (Michereff et al. 2005). A interação de bactérias com diversas culturas (arroz, soja, gramíneas) tem sido muito estudada, em razão do seu potencial biotecnológico evidenciado no aumento da produtividade das culturas, ocasionando uma redução dos custos de produção ao diminuir a quantidade de adubos nitrogenados, e conseqüentemente, melhorando a conservação dos recursos ambientais (Kuss, 2006 ; Baldani et al., 1986)

1.3 Indicadores bioquímicos do solo

As propriedades biológicas e bioquímicas do solo, tais como: biomassa microbiana, atividade respiratória e atividade enzimática, são indicadores utilizados no monitoramento de alterações ambientais decorrentes do uso agrícola, sendo estes, ferramentas importantes para orientar o planejamento e a avaliação das práticas de manejo utilizadas (Matsuoka et. al., 2003; Turco et al., 1994; Santana & Bahia Filho, 1998; Doran & Parkin, 1994).

A biomassa microbiana do solo, segundo (Zilli et.al., 2003; De-Polli & Guerra, 1997), permite a avaliação do *pool* de carbono e, também, de outros nutrientes, pois os microrganismos estes atuam nos processos de transformação e imobilização de nutrientes do solo (Lisboa et. al., 2009). A razão entre o CO₂ evoluído e o pool de carbono da biomassa microbiana fornece o quociente metabólico (qCO_2), que indica o estado

metabólico dos microrganismos e pode ser utilizado como indicador do ecossistema (Zilli et.al., 2003; De- Polli & Guerra, 1997). Através dessa abordagem, tem-se observado que a biomassa microbiana responde de maneira diferenciada aos manejos agrícolas adotados em cada agroecossistema (Zilli et.al.,2003; Cattelan & Vidor, 1990; Moreira & Siqueira, 2006).

Segundo Araujo, 2008, a respiração microbiana do solo é um processo que reflete a atividade biológica do solo, sendo definidos como a produção de CO₂ ou o consumo de O₂ como resultado de processos metabólicos de organismos vivos presentes no solo. Essa análise é um complemento na determinação da biomassa microbiana, pois ela informa o quanto esta comunidade microbiana está ativa para uma determinada biomassa (Lisboa, 2009).

A atividade das enzimas possui elevado potencial para a avaliação da qualidade do solo em sistemas agrícolas, por apresentarem alta sensibilidade, permitindo avaliações logo após a ocorrência das perturbações no solo (Lisboa et.al., 2012; Gil-Sotres et al., 2005). Dentre as enzimas mais utilizadas encontram-se β-glucosidase, arilsulfatase e a urease. A enzima β-glucosidase é importante no ciclo do carbono, pois os produtos gerados pela enzima servem como fonte de energia para microrganismos do solo (Araujo, 2008, Lisboa, 2009, Dick et al, 1996). A enzima arilsulfatase é importante no ciclo do fósforo, sendo responsável pela mineralização de fosfato orgânico (Araujo, 2008, Frighetto & Monteiro 2000). E por fim a uréase que participa da reação de hidrólise da uréia aCO₂ e NH³⁺ sendo um bom indicador de prática de adubação mineral e orgânica (Gill-Sotres et al., 2005)

Estes indicadores do solo são susceptíveis a variações de acordo com as práticas de manejo adotadas, indicando que o sistema pode estar evoluindo para um aumento ou redução da qualidade do solo. Sistemas de culturas ou pastejos determinam modificações nas condições originais do solo, através de sua mobilização e diferenciação no aporte de material orgânico. Todo este conjunto de alterações tem reflexos sobre a microbiota do solo e, portanto, sobre a atividade dos microrganismos e, conseqüentemente, na qualidade do solo como um todo (Lisboa et. al. 2012; Vargas & Scholles, 2000).

1.4 O acesso à diversidade bacteriana

O solo é um dos ambientes mais complexos da Terra, sendo assim é muito difícil estudá-lo, mas ao mesmo tempo ele desperta um grande interesse porque possui a maior diversidade bacteriana de todos os ambientes na Terra (Roesch et al. 2007). Há evidências de que uma amostra de solo contém milhares de espécies microbianas e a maioria das bactérias do solo (99,5 a 99,9%) observadas por microscopia não podem ser isoladas e cultivadas em laboratório. As bactérias isoladas representam a menor proporção da diversidade bacteriana total do solo (Torsvik et al. 1990).

A aplicação de ferramentas e métodos de identificação e detecção molecular ajuda a desvendar as relações filogenéticas das comunidades microbianas. Uma combinação de métodos, incluindo técnicas de cultivo clássicas e técnicas independentes de cultivo asseguram uma visão abrangente da comunidade bacteriana nos diferentes ambientes (Hartmann et al. 1997, Liesack et al. 1997).

Os genes de RNA ribossômicos bacterianos, especialmente de 16S rRNA são excelentes marcadores moleculares para estudos filogenéticos devido a sua conservação funcional, sua ampla distribuição e por incluir regiões altamente conservadas e outras altamente variáveis dentro da sequência. Esta abordagem filogenética molecular pode ser usada tanto para identificar bactérias isoladas como para acessar a diversidade de comunidades complexas (Amann et al. 1995, Rappe & Giovannoni 2003).

Utilizando culturas puras muitas espécies bacterianas já foram descritas em todo o mundo. Torsvik e colaboradores (1990), através de estudos de renaturação de DNA extraído de amostras de solo, estimaram em 4.000 o número de genomas bacterianos completamente diferentes em apenas uma determinada amostra. Estes mesmos autores concluíram que somente 0,3% das bactérias presentes no solo é cultivável em condições de laboratório e estes dados vêm sendo confirmados por estudos de hibridização *in situ*, utilizando oligonucleotídeos como sondas (Amann et al. 1995).

Woese (1987), utilizando sequências de rRNA 16S e 18S causou uma revolução na classificação dos organismos, que culminou na divisão da vida na Terra em três grandes domínios: Archaea, Bacteria e Eucarya. Os microbiologistas passaram, então, a usar métodos para classificação dos microrganismos baseados na sequência do rRNA 16S, sem necessidade de cultivo (Pace, 1997). Bastava amplificar, por PCR, o rRNA 16S, extraído diretamente do ambiente, clonar e sequenciar. Como resultado das novas abordagens de

estudo, o domínio Bactéria passou de 12, em 1984, para de 36 divisões, em 1991, 13 destas sendo caracterizadas apenas por sequências de rRNA 16S obtidas do ambiente (Hugenholtz et al. 1998). Enquanto algumas divisões são cosmopolitas, outras parecem ser restritas a algumas partes do globo. Noventa por cento das bactérias cultivadas pertencem a apenas quatro divisões: *Proteobacteria*, *Cytophagales*, *Actinobacteria* e Gram positivas com baixo conteúdo GC (Hugenholtz et al. 1998).

Tudo indica que ainda há uma enorme diversidade de microrganismos a ser descoberta. Em um trabalho publicado por Borneman e Triplett, em 1987, realizado com solo da Amazônia, por exemplo, utilizando o sequenciamento de rRNA 16S sem cultivo, foram sequenciados 100 fragmentos de rRNA 16S e nenhuma sequência havia sido previamente descrita. Doze das sequências não puderam ser classificadas em nenhuma divisão já existente. É importante lembrar que uma melhor filogenia das bactérias pode ser feita analisando-se, também, outros *loci* não ligados ao rRNA 16S, como já está sendo feito com os genes *fla* de *Borrelia* e *Listeria* ou os genes *asd* de *Vibrio* (Palys et al. 1997).

Como dito anteriormente, o Bioma Pampa é um ecossistema negligenciado entre todos que se encontram em território brasileiro. Desta forma, os estudos de ecologia microbiana que busquem começar a elucidar e aumentar e consolidar os conhecimentos a respeito da diversidade bacteriana que ali ocorre, podem auxiliar no entendimento destes para estudos conservacionistas e melhores práticas de manejo buscando preservar esta área. Utilizando-se técnicas de biologia molecular poderá ser mostrado o que ocorre com a comunidade microbiana nos diferentes tipos de manejo e as mudanças na dinâmicas das populações bacterianas.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

O presente trabalho teve por objetivo estudar a estrutura da comunidade bacteriana e os indicadores bioquímicos da qualidade do solo de uma área do bioma Pampa com cinco diferentes intensidades de pastejo: alta pressão de pastejo, pressão de pastejo moderada, baixa pressão de pastejo, uma área de vegetação nativa e uma área de vegetação regenerada.

Objetivos Específicos

- a) Isolar as bactérias potencialmente diazotróficas associadas a estes sistemas de manejos;
- b) Identificar as espécies bacterianas presentes nas áreas com diferentes tipos de manejo através do sequenciamento do gene 16S rRNA;
- c) Extrair o DNA metagenômico do solo associado a estas diferentes áreas de manejo do Bioma Pampa;
- d) Utilizar a técnica de PCR-RFLP do gene 16S rRNA e *nifH* para diferenciar as comunidades bacterianas do solo;
- e) Utilizar indicadores bioquímicos do solo como indicadores da qualidade do solo tendo em vista sua sensibilidade para determinar o impacto de diferentes sistemas de manejo no solo;
- f) Correlacionar os parâmetros bioquímicos com os parâmetros químicos dos solos amostrados.

Capítulo I

Microbial quality of a soil of the Pampa biome changed by different grazing pressures

Artigo a ser submetido na revista *Soil Biology and Biochemistry*

1 **Microbial quality of a soil of the Pampa biome changed by different grazing**
2 **pressures**

3

4 Rafael S. Vargas^a, Renata Bataioli^b, Pedro B. da Costa^a, Bruno Lisboa^c, Luciane Maria P.
5 Passaglia^a, Anelise Beneduzi^c, Luciano K. Vargas^{c*}

6

7 ^a Federal University of Rio Grande do Sul, Institute of Biosciences, Department of
8 Genetics. Av. Bento Gonçalves, 9500, Caixa Postal 15.053, CEP 91501-970, Porto Alegre,
9 RS, Brazil.

10 ^b UNILASALLE Lasalle University Center, Av. Victor Barreto, 2288, CEP 92010-000,
11 Canoas, RS, Brazil.

12 ^cState Foundation for Research in Agriculture (Fundação Estadual de Pesquisa em
13 Agropecuária - FEPAGRO), Rua Gonçalves Dias, 570, CEP 90130-060, Porto Alegre, RS,
14 Brazil.

15

16 *Corresponding author at: Fundação Estadual de Pesquisa em Agropecuária (FEPAGRO),
17 Rua Gonçalves Dias, 570, CEP 90130-060, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel: +55 51 3288
18 8056. E-mail address: luciano-kayser@fepagro.rs.gov.br

19

20 **Abstract**

21 The grasslands of the Pampa biome have been typically used in extensive breeding systems
22 of beef cattle, with little or no contribution of external inputs. In natural environments or

23 with little human intervention, such as traditional grazing systems of the Pampa biome, the
24 soil microbiota plays a role in the ecosystem functioning. This study aimed to evaluate the
25 impact of different grazing pressures on the activity and diversity of soil bacteria. We
26 performed one long-term experiment in Eldorado do Sul, Brazil, which assessed three
27 levels of grazing pressure: high grazing pressure (HP), with 4% herbage allowance (HA);
28 moderate grazing pressure (MP), with 12% HA; and low grazing pressure (LP), with 16%
29 HA. Two reference areas were also assessed, an area of never-grazed native vegetation
30 (NG) and an area of regenerated vegetation after two years of grazing (RG). Soil samples
31 were evaluated for microbial biomass; β -glucosidase, arylsulfatase and urease activities;
32 and biochemical indicators of soil quality. The structure of the bacterial community and the
33 population of diazotrophic bacteria were also evaluated by RFLP of the 16S rRNA and
34 nifH genes, respectively. The diversity of diazotrophic bacteria was assessed by partial
35 sequencing of the 16S rDNA gene. The presence of grazing animals favored the soil
36 microbial community, and consequently, the overall geometric mean of the biochemical
37 characteristics was significantly higher in MP and HP. The structures of the bacterial
38 community and the populations of diazotrophic bacteria were changed by the different
39 grazing managements, with a greater diversity of culturable diazotrophic bacteria observed
40 in the LP treatment. Considering all the biochemical and microbiological characteristics
41 evaluated in this study and the history of the area, adoption of the MP treatment seems the
42 most appropriate for animal production and conservation of the Pampa biome.

43

44 Keywords: Grasslands, Soil Microbial Communities, Microbial Biomass, Enzyme
45 Activity, Diazotrophic Bacteria, Bacterial Diversity

46

47 **1. Introduction**

48 Between the latitudes 24° and 35° S, occupying an area of 500,000 km², lies the Pampa
49 biome, which covers Uruguay, the northeast of Argentina, the south of Brazil and part of
50 Paraguay (Pallarés *et al.*, 2005). This biome is characterized as an ecosystem composed of
51 herbaceous native plants, classified as steppe in the international phytogeographic system
52 (Berreta, 2001). It is recognized for its great diversity, characterized by the existence of
53 approximately 450 grasses and 200 forage legumes (Boldrini, 2007).

54

55 Since European immigrants introduced the first herds in the seventeenth century (Bilenca
56 & Miñarro, 2004), livestock production has been one of the main economic activities of the
57 region, with the natural grassland as the feeding basis for animal production (Carvalho &
58 Batello, 2009). Thus, historically, the natural grasslands of the Pampa biome have been
59 used in extensive systems of beef cattle breeding, which are characterized by low
60 environmental impact, with little or no contribution of external inputs (Viglizzo *et al.*,
61 2001). However, in recent decades, the ecosystem has been threatened by the introduction
62 of exotic forage species, the exploitation of planted forests and the introduction of annual
63 crops (Carvalho & Batello, 2009). Even in areas still managed by the traditional livestock
64 system, there are risks associated with overstocking (Carvalho *et al.*, 2006). Conte *et al.*
65 (2011) claim that the adjustment of the amount of animals to the herbage allowance is
66 critical to the sustainability of natural pastures. The authors found a decrease in labile
67 carbon and an increase in soil density with the reduction in the herbage allowance in an
68 area of the Pampa biome. In addition to the loss of soil physical quality, often resulting in
69 water erosion and compaction of the surface layers (Bertoli *et al.*, 2000), excessive
70 stocking rate may also result in decreased plant diversity (Soares *et al.*, 2003).

71 In natural environments or environments with little human intervention, such as traditional
72 grazing systems of the Pampa biome, the soil microbiota plays vital roles in maintaining
73 the ecosystem. The cycling of organic matter, nutrient availability and formation and
74 stabilization of aggregates are a direct result of microbial activity, directly influencing the
75 productivity, diversity and composition of plant communities (Van Der Heijden *et al.*,
76 2008). Pastures grown without fertilization, in soils with low natural fertility (Streck *et al.*,
77 2008), are nutritionally poor environments, where the symbiotic microorganisms are
78 responsible for the acquisition of the scarce nutrients by plants (Cleveland *et al.*, 1999; Van
79 der Heijden *et al.*, 2008). Diazotrophic bacteria, for example, assume an even more
80 relevant role than in other agricultural systems, being the main source of N for the
81 vegetation (Van der Heijden *et al.*, 2006).

82

83 Like the physical quality, the soil microbiological quality can also be affected by pasture
84 management. Northrup *et al.* (1999) found a decrease in the microbial biomass in soils
85 under intensive grazing. The authors attributed the result to a lower input of organic C with
86 increasing grazing intensity. Similarly, Holt (1997) noted that, in addition to the microbial
87 biomass, enzyme activity was also reduced with excessive grazing in an Australian soil.
88 Moreover, changes in the floristic composition of the pasture may also result in changes in
89 the structure of the soil microbial community, with consequences in its functionality
90 (Johnson *et al.*, 2003). As the pastures are formed by a rich diversity of plants, the
91 consequences of changes in diversity and activity of soil microorganisms become more
92 unpredictable than in less complex environments, such as annual crops.

93

94 Considering the importance of the microbiological processes for the preservation of the
95 Pampa biome and, at the same time, for allowing their economic exploitation, this study
96 aimed to evaluate the impact of different grazing pressures on the microbial activity and
97 the diversity of soil bacteria.

98

99 **2. Materials and Methods**

100 *2.1. Soil sampling*

101 One long-term experiment, located at the Agronomic Experimental Station of the Federal
102 University of Rio Grande do Sul (30°05' S, 51°40' W, and 46 m altitude), in Eldorado do
103 Sul, Brazil, was performed. The experiment has been performed since 1986, with different
104 levels of grazing pressure, in an area of natural grassland representative of the phyto-
105 physiognomy of the fields of the center of the state (Boldrini *et al.*, 2010), which is part of
106 the Pampa biome. The soil of the experimental location was a Paleudult. The area has been
107 maintained without any form of human intervention, except for the adjustment of the
108 grazing pressures, which were assessed on average every 28 days using the put-and-take
109 technique.

110

111 Soil samples were collected in triplicate in the 0-5 cm layer, composing a completely
112 randomized design. Some of the samples were intended for evaluations of microbial soil
113 quality, and the others were used to characterize the chemical properties of the soil by
114 standard methods described in Tedesco *et al.* (1995) (Table 1).

115 The treatments consisted of three levels of grazing pressure: high grazing pressure (HP),
116 with 4% herbage allowance (HA); moderate grazing pressure (MP), with 12% HA; and
117 low grazing pressure (LP), with 16% HA. Two reference areas were also evaluated: an area

118 of never-grazed native vegetation (NG) and another with a regenerated vegetation (RG),
119 which was grazed for two years and excluded from grazing since 1988. In the experimental
120 unit subjected to HP, there was only one layer of vegetation, homogeneous and with a low
121 canopy profile, in which the most frequent species are of the genera *Paspalum*, *Axonopus*,
122 *Piptochaetium* and *Coelorachis*. In the other experimental units, there was an upper extract
123 formed mainly by species of the genera *Aristida*, *Eryngium*, *Andropogon*, *Baccharis* and
124 *Vernonia*, resulting in a bimodal pasture structure and a mosaic pattern (Corrêa and
125 Maraschin, 1994).

126

127 2.2. Biochemical characteristic of the soil

128 Soil samples were evaluated for microbial biomass (MB), according to the method
129 proposed by Horwath *et al.* (1996). The methods proposed by Dick *et al.* (1996) were used
130 to assess the activity of the enzymes β -glucosidase (carbon cycle), arylsulfatase (sulfur
131 cycle) and urease (nitrogen cycle). Determination of β -glucosidase and arylsulfatase
132 activities was based on the actions of the enzymes on their specific substrates, forming as a
133 product *p*-nitrophenol, which was quantified by colorimetric analysis. The urease
134 assessment was based on the release of ammonium (NH_4^+) by the action of the enzyme on
135 urea during the incubation period. NH_4^+ was quantified by distillation and titration
136 according to Tedesco *et al.* (1995).

137

138 A geometric mean of the biochemical characteristics, adapted from Hinojosa *et al.* (2004)
139 and used as a general indicator of soil quality, was calculated using the formula $\text{GMba} =$
140 $(\text{MB} \times \text{AS} \times \beta\text{G} \times \text{Ur})^{1/4}$, in which MB, AS, βG and Ur represent the microbial biomass and
141 the activities of arylsulfatase, β -glucosidase and urease, respectively. The data obtained,

142 both the biochemical characteristics and the GMba, were submitted to analysis of variance
143 (ANOVA), and the means were compared using the Scott-Knott test (Sisvar 5.1 Build 72)
144 at the significance level of 0.05 (Ferreira, 2011).

145

146 *2.3. DNA extraction from the soil and evaluation of the structure of the bacterial* 147 *community*

148 The DNA from the soil was extracted from 300 mg of soil using the kit NucleoSpin® Soil
149 (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions. The purified DNA was
150 used for the amplification reactions with primers specific for the 16S rRNA (Felskeet *al.*,
151 1999) and nifH genes (Poly *et al.*, 2001). PCR mixes contained 50 ng of template DNA, 1x
152 reaction buffer, 1 U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen®), 100 µM each deoxynucleotide, 1
153 µM each primer, 50 mM MgCl₂ and ultrapure water to a final volume of 25 µl.
154 Amplifications were performed using an initial cycle of denaturation at 94°C for 5 min,
155 followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing for 1 min at 56°C (for
156 16S rDNA) or 55°C (for nifH) and extension at 72°C for 1 min, followed by a final
157 extension cycle at 72°C for 5 min. The PCR products were visualized on a 1% agarose gel
158 stained with Blue Green Loading Dye I (LGCBiotecnologia) and then subjected to
159 restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis.

160

161 The restriction procedure was adapted from Widmer *et al.* (1999) with the addition of 6 µl
162 of PCR product to 40 µl of a mixture of ultrapure water, 2 U of the restriction enzyme and
163 its corresponding buffer. The enzymes used were *Hae*III, *Hind*III and *Msp*I, and the
164 incubation was performed at 37°C for at least 16 h to ensure complete digestion of the
165 PCR products. The digestion products were resolved by electrophoresis for 3 h with a

166 current of 200 V in 10% polyacrylamide gels in 1x TBE buffer stained with silver nitrate.
167 The images of the gels were analyzed using Gel-Pro Analyzer 3.1 software, generating a
168 binary matrix. The matrices were analyzed with Paleontological Statistics (PAST) software
169 (Hammer *et al.*, 2007), and the similarity dendrograms was quantified using the Jaccard
170 coefficient.

171

172 *2.4. Isolation, identification and diversity analysis of culturable diazotrophs*

173 Ten grams of soil sample was suspended in sterile saline solution (0.85% NaCl) and
174 incubated at 28°C with shaking for 16 h. Next, serial dilutions (up to 10⁻³) were made, and
175 0.1 ml aliquots were removed and inoculated on three semi-solid media lacking N, NFb,
176 LGI and LGI-P. The procedures for bacterial isolation were performed according
177 Döbereiner *et al.* (1995).

178 The 100 bacterial isolates were subjected to PCR for partial amplification (approximately
179 450 bp) of the 16S rRNA gene (Felske *et al.*, 1999). The amplification products were
180 sequenced in the ACT-Gene Laboratory (Center of Biotechnology, UFRGS, RS, Brazil)
181 using an automatic sequencer (ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer 50 cm capillary,
182 Applied Biosystems). The 16S rRNA sequences were analyzed using the BLASTN
183 program (NCBI BLAST[®] 147 homepage).

184 Using PAST, the Shannon diversity index (H' , Shannon and Weaver, 1949), the
185 dominance (D) and the equitability (J) were calculated from the number of isolates
186 belonging to each taxon. Principal coordinate analysis (PCA) was used to determine the
187 statistical correlations between soil properties and population diversity.

188

189 **3. Results**

190 *3.1. Biochemical characteristics indicative of the soil quality*

191 The biochemical properties of the soils were significantly influenced by the different
192 grazing management, as summarized in Table 2. The NG vegetation had the lowest values
193 for all biochemical parameters evaluated, similar to those observed in the LP treatment.
194 The overall geometric mean of the biochemical characteristics was significantly higher in
195 the MP and HP treatments.

196

197 *3.2. Bacterial diversity of the soil*

198 The structure of the soil bacterial community was assessed by RFLP on the amplification
199 products of the 16S rRNA and nifH genes (Fig. 1). The diversity of culturable diazotrophic
200 bacteria was also analyzed by partial sequencing of the 16S rRNA gene (Table 3). The
201 analysis of the RFLP profiles of the 16S rRNA gene revealed a distinct structure of
202 bacterial communities in the different treatments. The NG treatment replicates were
203 grouped in an isolated cluster, with approximately 60% similarity with the other profiles. A
204 second subdivision, with nearly 70% similarity, contained the samples of the HP treatment.
205 Samples of the MP, LP and NG treatments showed a more similar profile with each other,
206 above 80% similarity.

207

208 The RFLP profiles of the nifH gene showed a more complex pattern, revealing more
209 variability between treatments and between replicates of some treatments. The LP
210 treatment differed from the others, forming a separate cluster, with a little over 20%
211 similarity. The NG treatment also formed an isolated cluster, with approximately 50%
212 similarity with the other treatments, which showed over 60% similarity with each other.

213

214 The assessment of the diversity of culturable diazotrophic bacteria confirmed the presence
215 of diverse populations in the different treatments. *Burkholderia* and *Enterobacter* were the
216 most ubiquitous bacteria, being identified in all treatments, with 51 and 30 isolates,
217 respectively. The smallest number of taxa was observed in HP, where only these two
218 genera were identified, while in the LP treatment seven genera were identified. The LP
219 treatment also showed the highest H' , the lowest D and the highest J, contrasting again
220 with HP.

221

222 *3.3. Relationships between the chemical properties and the biochemical characteristics of* 223 *the soil*

224 PCA was used to investigate the relationships between the biochemical characteristics and
225 the chemical properties of the soil under the different treatments. The main components of
226 the PCA (PC1 and PC2) explained 86.2% of the total data variation, with PC1 counting for
227 49.1% and PC2 for 37.1% (Fig. 2). The MP and HP treatments were positioned on the left
228 in PC1 and were more associated with the biochemical characteristics. The urease activity
229 was associated with the soil pH, while the other biochemical characteristics were
230 associated with OM and the P content of the soil. This observation was supported by the
231 fact that significant positive correlations were also found between OM and the activities of
232 arylsulfatase ($r = 0.96$; $p = 0.0078$) and β -glucosidase ($r = 0.92$; $p = 0.0254$). In the
233 opposite position in PC1 were the NG and LP treatments. The diversity of the diazotrophic
234 bacteria was related to the clay and basic cation (Ca^{2+} , Mg^{2+} and K^+) contents.

235

236

237 4. Discussion

238 In this study, we investigated the long-term effects of increasing grazing pressures on the
239 microbial quality of a soil compared with two control areas maintained without grazing.
240 All analyzed variables were significantly affected by the treatments, showing that the
241 presence of cattle was beneficial in terms of microbiological quality of the soil.

242

243 The microbial biomass increased with the increase in grazing intensity and in the number
244 of animals per area in the MP and HP plots. Similarly, Wang *et al.* (2006) observed an
245 increase in microbial biomass in areas under intensive grazing in comparison with an area
246 excluded from grazing. Likewise, Iyyemperumal *et al.* (2007) observed an increase in
247 microbial biomass with the increase in dejection deposition in grassland ecosystems, which
248 increases with the number of animals per area. The waste deposited in the soil by grazing
249 animals may stimulate the microbiota for being a labile organic matter, more readily
250 available than the original plant material (Prieto *et al.*, 2011). Grazing also promotes the
251 growth and renewal of the plant root system, with a consequent increase in the rhizosphere
252 effect. Hamilton *et al.* (2008) observed that defoliation, simulating what occurs during
253 grazing, increased by 1.5 times the production of root exudates of *Poa pratensis*, resulting
254 in a proportional increase in the microbial biomass.

255

256 The soil enzymatic activity controls the cycling of nutrients through the processes of
257 mineralization of OM and constitutes an important indicator of the functional capacity of
258 the soil (Mijangos *et al.*, 2006). β -Glucosidase, urease and arylsulfatase participate in the
259 cycles of C, N and S, respectively. The activities of these hydrolytic enzymes have been
260 widely used in assessments of soil quality because they are highly sensitive to disturbances

261 in the soil (Bandick and Dick, 1999; Matsuoka *et al.*, 2003). Our results show that the
262 enzyme activity followed the same trend as the microbial biomass and the GMba, as it was
263 higher in the MP and HP treatments compared with the LP and NG treatments. Similar
264 results were obtained by Esch *et al.* (2013), who observed a linear increase in enzymatic
265 activity with increasing grazing pressure. As discussed for microbial biomass, the
266 enzymatic activity is favored by the deposition of animal dejections (Bol *et al.*, 2003) and
267 the rhizosphere effect (Reddy *et al.*, 1987). Previous studies performed in the same area
268 showed a linear increase in root mass of native grassland with increasing grazing pressure
269 (Conte *et al.*, 2011), which seems to be accompanied by increased enzymatic activity.

270

271 The microbial community structure was also altered by the treatments. Regarding the
272 bacterial community in general, the NG area had a completely different structure. These
273 non-grazed areas often have microbial communities different from the grazed areas (Frank
274 *et al.*, 2003; Ford *et al.*, 2013), and the changes caused by grazing seem to occur more
275 rapidly than an eventual recovery of the original structure after interruption of grazing
276 (Attard *et al.*, 2008).

277

278 On the other hand, another treatment that was distinguishable from the others in terms of
279 microbial community structure was HP. A similar result was observed by Zhou *et al.*
280 (2010), who found that microbial communities of non-grazed areas and intensely grazed
281 areas were different from those of areas under moderate and low intensities of grazing. It is
282 expected that the presence of grazing animals will alter the microbial community structure
283 mainly by modifying the composition of the plant community and by modifying the
284 contribution of organic C, especially the labile fraction (Attard *et al.*, 2008). As revealed

285 by previous studies carried out in the same experimental area, the treatments applied over
286 the years differ both with respect to their floristic composition and in relation to the
287 availability of labile C. In both aspects (considered crucial to the microbial community
288 structure), the HP treatment differed dramatically from the others, presenting a smaller
289 plant diversity (Corrêa and Maraschin, 1994) and a reduction in the soil labile organic C
290 (Conte *et al.*, 2011).

291

292 Due to its importance for the functioning of a managed ecosystem without the contribution
293 of external inputs, the structure of the diazotrophic bacteria community was assessed by
294 the procedure proposed by Poly *et al.* (2001). Just as those authors observed that the *nifH*
295 gene pool was different in soil under cultivation compared with a natural pasture, we
296 observed the effect of grazing on the structure of the nitrogen-fixing community.
297 Compared with the 16S rRNA gene, the RFLP on amplification products of the *nifH* gene
298 produced results with higher variability. Additionally, more than the NG treatment, the LP
299 soil stood out compared to the others. These results are consistent with reports that the
300 composition of the *nifH* gene pool varies between soils and between microenvironments
301 within a soil (Widmer *et al.*, 1999; Poly *et al.*, 2001; Soares *et al.*, 2006).

302

303 The presence of a distinct community in the LP treatment was confirmed by the analysis of
304 culturable diazotrophic bacteria. In this treatment, the largest number of genera, the highest
305 H' , the lowest D and the highest J were identified, indicating that the nitrogen-fixing
306 microorganisms benefitted from both the diversity of plant species and the presence of
307 animals in this plot.

308

309 The diversity of diazotrophic bacteria has been attributed to several abiotic factors
310 (Reardon *et al.*, 2014). In this study, PCA revealed an association with the soil texture and
311 aspects related to soil fertility, most notably the presence of the basic cations Ca, Mg and K.
312
313 In a previous study carried out in the same area, Conte *et al.* (2011) observed an increase in
314 density and a reduction of labile carbon with the most intensive grazing, suggesting that
315 this treatment would result in a loss of soil quality. This trend was not confirmed in our
316 study, demonstrating that the natural grasslands of the Pampa biome are complex systems,
317 in which the reduction of a soil quality indicator will not necessarily be accompanied by
318 the reduction of others. However, considering the set of biochemical and microbiological
319 characteristics evaluated in the present study and the history of the area in terms of
320 individual animal performance (Mezzalira *et al.*, 2012), chemical and physical
321 characteristics of the soil (Conte *et al.*, 2011) and floristic composition (Corrêa and
322 Maraschin, 1994), the adoption of the MP treatment seems the most appropriate for animal
323 production and conservation of the Pampa biome.

324

325 **5. Conclusion**

326 This study evaluated the microbiological quality of a soil of the Pampa biome under
327 different grazing intensities. In general, the presence of grazing animals was beneficial for
328 the soil microbial community. Higher intensities of grazing favored the increase in
329 microbial biomass and the enzymatic activity. The lowest grazing level showed a greater
330 diversity of diazotrophic bacteria. New studies on the microbial diversity in pastures of the
331 Pampa biome are underway and will improve our understanding of the effects of different
332 grazing intensities on the microbial community in soils of this complex ecosystem.

333

334 **Acknowledgments**

335 The authors thank Prof. Paulo César de Faccio Carvalho (Faculdade de Agronomia,
336 UFRGS, RS, Brazil) for providing access to the experimental area. This work was financed
337 by a grant from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
338 (CNPq/Brazil) and the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) da Fixação
339 Biológica do Nitrogênio (Brazil).

340

341 **References**

- 342 Attard, E., Degrange, V., Klumpp, K., Richaume, A., Soussana, J.F., Roux, X.L., 2008.
343 How do grassland management history and bacterial micro-localisation affect the
344 response of bacterial community structure to changes in aboveground grazing regime?
345 Soil Biology and Biochemistry 40, 1244–1252.
- 346 Bandick, A.K., Dick, R.P., 1999. Field management effects on soil enzyme activities. Soil
347 Biology and Biochemistry 31, 1471-1479.
- 348 Berreta, E., 2001. Ecophysiology and management response of the subtropical grasslands
349 of Southern America. In: Gomide, J.A., Mattos, W.R.S., Silva, S.C. (Eds.) XIX
350 International Grassland Congress, Proceedings... p.939-946.
- 351 Bertol, I., Almeida, J.A., Almeida, E.X., Kurtz, C., 2000. Soil physic properties related to
352 forage offer levels of dwarf elephant grass cv. Mott. Pesquisa Agropecuária Brasileira
353 35, 1047-1054.
- 354 Bilenca, D., Miñarro, F., 2004. Identificación de áreas valiosas de pastizal en las Pampas y
355 Campos de Argentina, Uruguay y Sur de Brasil. Fundación vida silvestre. 323p.

356 Bol, R., Kandeler, E., Amelung, W., Glaser, B., Marx, M.C., Preedy, N., Lorenz, K., 2003.
357 Short-term effects of dairy slurry amendment on carbon sequestration and enzyme
358 activities in a temperate grassland. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 1411–1421.

359 Boldrini, I.I., 2007. Grasslands in southern Brazil: origin, history and modifiers. In: II
360 Symposium on forage and animal production, Proceedings... pp. 7-13.

361 Boldrini, I.I., Ferreira, P.P.A., Andrade, B.O., Schneider, A.A., Setubal, R.B., Trevisan, R.,
362 Freitas, E.M. 2010. Pampa Biome: floristic diversity and physiognomy. Pallotti, Porto
363 Alegre, 64p.

364 Carvalho, P.C.F., Batello, C., 2009. Access to land, livestock production and ecosystem
365 conservation in the Brazilian Campos biome: the natural grasslands dilemma. *Livestock*
366 *Science* 120,158-162.

367 Carvalho, P.C.F., Fischer, V., Santos, D.T., Ribeiro, A.M.L., Quadros, F.L.F., Castilhos,
368 Z.M.S., Poli, C.H.E.C., Monteiro, A.L.G., Nabinger, C., Genro, T.C.M., Jacques,
369 A.V.A., 2006. Animal production in the Southern Grasslands Biome. *Brazilian Journal*
370 *of Animal Science* 35, 156-202.

371 Cleveland, C.C., Townsend, A.R., Schimel, D.S., Fisher, H., Howarth, R.W., Hedin, L.O.,
372 Perakis, S.S., Latty, E.F., von Fischer, J.C., Elseroad, A., Wasson, M.F., 1999. Global
373 patterns of terrestrial biological nitrogen (N₂) fixation in natural ecosystems. *Global*
374 *Biogeochemical Cycles* 13, 623–645.

375 Conte, O., Wesp, C.L., Anghinoni, I., Carvalho, P.C.F., Levien, R.; Nabinger C., 2011.
376 Soil density, aggregation and carbon fractions of an Alfisol under natural pasture and
377 different herbage allowance. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 35,579-587.

378 Corrêa, F.L., Maraschin, G.E., 1994. Growth and disappearance in a natural pasture under
379 four levels of forage on offer. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 29, 1617-1623.

380 Dick, P.R., D.P. Breakwell, Turco. R.F., 1996. Soil enzyme activities and biodiversity
381 measurements as integrative microbiological indicators. In Doran, J. W., Jones, A. J.
382 (Eds.) *Methods for assessing soil quality*, SSSA, Madison, pp. 247-271.

383 Döbereiner, J., Baldani, V.L.D., Baldani, J.I., 1995. How to isolate and identify diazotrophs
384 of non-leguminous plants. Embrapa –SPI, Brasília, 60 pp.

385 Esch, E.H., Hernández, D.L., Pasari, J.R., Kantor, R.S.G., Selmants, P.C., 2013. Response
386 of soil microbial activity to grazing, nitrogen deposition, and exotic cover in a
387 serpentine grassland. *Plant and Soil* 366, 671–682.

388 Felske, A., Wolterink, A., Van Lis, R., De Vos, W.M., Akkermans, A.D.L., 1999.
389 Searching of predominant soil bacteria 16S rDNA cloning versus strain cultivation.
390 *FEMS Microbiology Ecology* 30, 137-145.

391 Ferreira, D.F., 2011. Sisvar: a computer statistical analyses system. *Ciencia e*
392 *Agrotecnologia* 35, 1039-1042.

393 Ford, H., Rousk, J., Garbutt, A., Jones, L., Jones, D.L., 2013. Grazing effects on microbial
394 community composition, growth and nutrient cycling in salt marsh and sand dune
395 grasslands. *Biology and Fertility of Soils* 49, 89–98.

396 Frank, D.A., Gehring C.A., Machut, L., Phillips, M., 2003. Soil community composition
397 and the regulation of grazed temperate grassland. *Oecologia* 137, 603–609.

398 Hamilton III, E.W., Frank, D.A., Hinchey, P.M., Murray, T.R., 2008. Defoliation induces
399 root exudation and triggers positive rhizospheric feedbacks in a temperate grassland.
400 *Soil Biology and Biochemistry* 40, 2865-2873.

401 Hammer, O., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2007. PAST – Palaeontological statistics software
402 for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4, 1-9.

403 Hinojosa, M.B., García-Ruiz, R., Viñepla, B., Carreira, J.A., 2004. Microbiological rates
404 and enzyme activities as indicators of functionality in soils affected by the Aznalcóllar
405 toxic spill. *Soil Biology and Biochemistry* 36, 1637–1644.

406 Holt, J.A., 1997. Grazing pressure and soil carbon, microbial biomass and enzyme
407 activities in semi-arid northeastern Australia. *Applied Soil Ecology* 5,143–149.

408 Horwath, W.R., Paul, E.A., Harris, D., Norton, J., Jagger, L., Horton, K.A., 1996. Defining
409 a realistic control for the chloroform fumigation incubation method using microscopic
410 counting and ¹⁴C substrates. *Canadian Journal of Soil Science* 76,459-467.

411 Iyyemperumal, K., Israel, D.W., Shi, W., 2007. Soil microbial biomass, activity and
412 potential nitrogen mineralization in a pasture: Impact of stock camping activity. *Soil*
413 *Biology and Biochemistry* 39, 149–157.

414 Johnson, D., Booth, R.E., Whiteley, A.S., Bailey, M.J., Read, D.J., Grime, J.P., Leake, J.R.,
415 2003. Plant community composition affects the biomass, activity and diversity of
416 microorganisms in limestone grassland soil. *European Journal of Soil Science* 54, 671–
417 678.

418 Matsuoka, M., Mendes, I.C., Loureiro, M.F., 2003. Microbial biomass and enzyme
419 activities in soils under native vegetation and annual and perennial cropping systems in
420 the region of Primavera do Leste (MT). *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 27, 425–
421 433.

422 Mezzalira, J.C., Carvalho, P.C.F., Trindade. J.K., Bremm, C., Fonseca, L., Amaral, M.F.,
423 Reffatti, M.V., 2012. Livestock and crop production on native pasture managed and
424 different herbage allowances for cattle. *Ciência Rural* 42, 1264-1270.

425 Mijangos, I., Pérez, R., Albizu, I., Garbisu, C., 2006. Effects of fertilization and tillage on
426 soil biological parameters. *Enzyme and microbial technology* 40, 100-106.

427 Northupa, B.K., Brown, J.R., Holt, J.A., 1999. Grazing impacts on the spatial distribution
428 of soil microbial biomass around tussock grasses in a tropical grassland. *Applied Soil*
429 *Ecology* 13, 259-270.

430 Pallarés, O.R., Berretta, E.J., Maraschin, G.E., 2005. The South American Campos
431 ecosystem. In: XXXIV Grasslands of the world, Proceedings... pp. 171-219.

432 Poly, F., Monrozier, L., Bally, R., 2001. Improvement in the RFLP procedure for studying
433 the diversity of nifH genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in*
434 *Microbiology* 152, 95-103.

435 Prieto, L.H., Bertiller, M.B., Carrera, A.L., Olivera, N.L., 2011. Soil enzyme and microbial
436 activities in a grazing ecosystem of Patagonian Monte, Argentina. *Geoderma* 162, 281-
437 287.

438 Reardon, C.L., Gollany, H.T., Wuest, S.B., 2014. Diazotroph community structure and
439 abundance in wheat–fallow and wheat–pea crop rotations. *Soil Biology and*
440 *Biochemistry* 69, 406-412.

441 Reddy, G.B., Faza, A., Bennett Jr, R., 1987. Activity of enzymes in rhizosphere and non-
442 rhizosphere soils amended with sludge. *Soil Biology and Biochemistry* 19, 203-205.

443 Soares, R.A., Roesch, L.F.W., Zanatta, G., Camargo, F.O., Passaglia, L.M.P., 2006.
444 Occurrence and distribution of nitrogen fixing bacterial community associated with oat
445 (*Avena sativa*) assessed by molecular and microbiological techniques.
446 *Applied Soil Ecology* 33, 221–234.

447 Soares, A.B., Carvalho, P.C.F., Garcia, E., Boldrini, I.I., Pontes, L.S., Velleda, G.L., Freitas,
448 M.R., Freitas, T.M.S., 2003. Herbage allowance and species diversity on native
449 pasture. *African Journal of Range and Forage Science* 20, 134-134.

450 Streck, E.V., Kampf, N., Dalmolin, R.S.D., Klamt, E., Nascimento, P.C., Schneider, P.,
451 2008. Solos do Rio Grande do Sul. Emater-RS, Porto Alegre, 222pp.

452 Tedesco, J.M., Gianelo, C., Bissani, C.A., Bohnen, H., Volkweiss, S.J., 1995. Analysis of
453 soils, plants and other materials. Boletim técnico 5, UFRGS, Porto Alegre, 174 pp.

454 Van der Heijden, M.G.A., Bakker, R., Verwaal, J., Scheublin, T.R., Rutten, M., van
455 Logtestijn, R., Staehelin, C., 2006. Symbiotic bacteria as a determinant of plant
456 community structure and plant productivity in dune grassland. FEMS Microbiology
457 Ecology 56, 178–187.

458 Van Der Heijden, M.G.A., Bardgett, R.D., Van Straalen, N.M., 2008. The unseen majority:
459 soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems.
460 EcologyLetters 11, 296–310.

461 Viglizzo, E.F., Lertora, F., Pordomingo, A.J., Bernardos, J.N., Roberto, Z.E., Del Valle, H.,
462 2001. Ecological lessons and applications from one-century of low external-input
463 farming in the pampas of Argentina. Agriculture, Ecosystems and Environment 83, 65–
464 81.

465 Wang, K.H., McSorley, R., Bohlen, P., Gathumbi, S.M., 2006. Cattle grazing increases
466 microbial biomass and alters soil nematode communities in subtropical pastures. Soil
467 Biology and Biochemistry 38, 1956-1965.

468 Widmer, F., Shaffer, B.T., Porteous, L.A., Seidler, R.J., 1999. Analysis of nifH gene pool
469 complexity in soil and litter at a Douglas fir forest site in the Oregon Cascade Mountain
470 Range. Applied and Environmental Microbiology 65, 374–380.

471 Zhou, X., Wang, J., Hao, Y., Wang, Y., 2010. Intermediate grazing intensities by sheep
472 increase soil bacterial diversities in an Inner Mongolian steppe. Biology and Fertility of
473 Soils 46, 817–824.

474

475 Table 1 - Soil chemical properties under different grazing pressures.

476

SAMPLE	Clay	OM	pH	P _{exc}	K _{exc}	Al _{exc}	Ca _{exc}	Mg _{exc}
	%	%	H ₂ O	(mg/dm ³)	(mg/dm ³)	(Cmol _c /dm ³)	(Cmol _c /dm ³)	(Cmol _c /dm ³)
NG	21	1.9	4.8	1.4	104	0.9	0.1	0.6
RG	30	2.9	4.4	2.2	128	1.4	0.3	0.7
LP	28	2.5	4.7	1.4	138	0.8	0.9	0.8
MP	19	3.6	5.0	2.2	79	1.3	0.1	0.5
HP	22	2.5	4.9	1.4	75	1.2	0.3	0.7

477 OM: organic matter content; exc: exchangeable

478 NG = never-grazed native vegetation; RG = regenerated vegetation; HP = high grazing

479 pressure; MP = moderate grazing pressure; LP = low grazing pressure

480 Table 2 – Biochemical characteristics of the soil under different grazing pressures.

481

Sample	Microbial biomass	Arylsulfatase	β -Glucosidase	Urease	GMba
	mg kg ⁻¹	mg p-nitrophenol kg soil ⁻¹ h ⁻¹		mg NH ₄ ⁺ kg soil ⁻¹ h ⁻¹	
NG	165 ^b	12.9 ^c	3.1 ^b	29.4 ^b	21.0 ^b
RG	255 ^a	20.2 ^a	5.0 ^a	21.2 ^b	27.2 ^b
LP	191 ^b	16.3 ^b	3.4 ^b	31.1 ^b	23.9 ^b
MP	249 ^a	21.6 ^a	6.9 ^a	31.1 ^b	32.7 ^a
HP	250 ^a	16.2 ^b	5.0 ^a	46.7 ^a	31.1 ^a

482 Means in the same column followed by the same letter do not differ from each other by the Scott-Knott test at
483 the significance level of 0.05.

484 NG = never-grazed native vegetation; RG = regenerated vegetation; HP = high grazing
485 pressure; MP = moderate grazing pressure; LP = low grazing pressure

486

487 Table 3 - Diversity of diazotrophic bacteria in soil under different grazing pressures.

488

Taxa	Sample					Total
	NG	RG	LP	MP	HP	
	Numberofindividuals					
<i>Enterobacter</i> sp.	11	6	4	5	4	30
<i>Pantoea</i> sp.	2	-	-	-	-	2
<i>Klebsiella</i> sp.	1	-	-	-	-	1
<i>Burkholderia</i> sp.	6	9	6	14	16	51
<i>Pseudomonas</i> sp.	-	1	3	1	-	5
<i>Achromobacter</i> sp.	-	2	-	-	-	2
<i>Erwinia</i> sp.	-	1	-	-	-	1
<i>Serratia</i> sp.	-	-	2	-	-	2
<i>Ochrobactrum</i> sp.	-	-	2	-	-	2
<i>Acetobacter</i> sp.	-	-	2	-	-	2
<i>Reichenowia</i> sp.	-	-	2	-	-	2
Diversity index						
<i>H'</i>	1.07	1.27	1.77	0.75	0.50	
<i>D</i>	0.40	0.34	0.19	0.55	0.68	
<i>J</i>	0.77	0.79	0.91	0.68	0.72	100

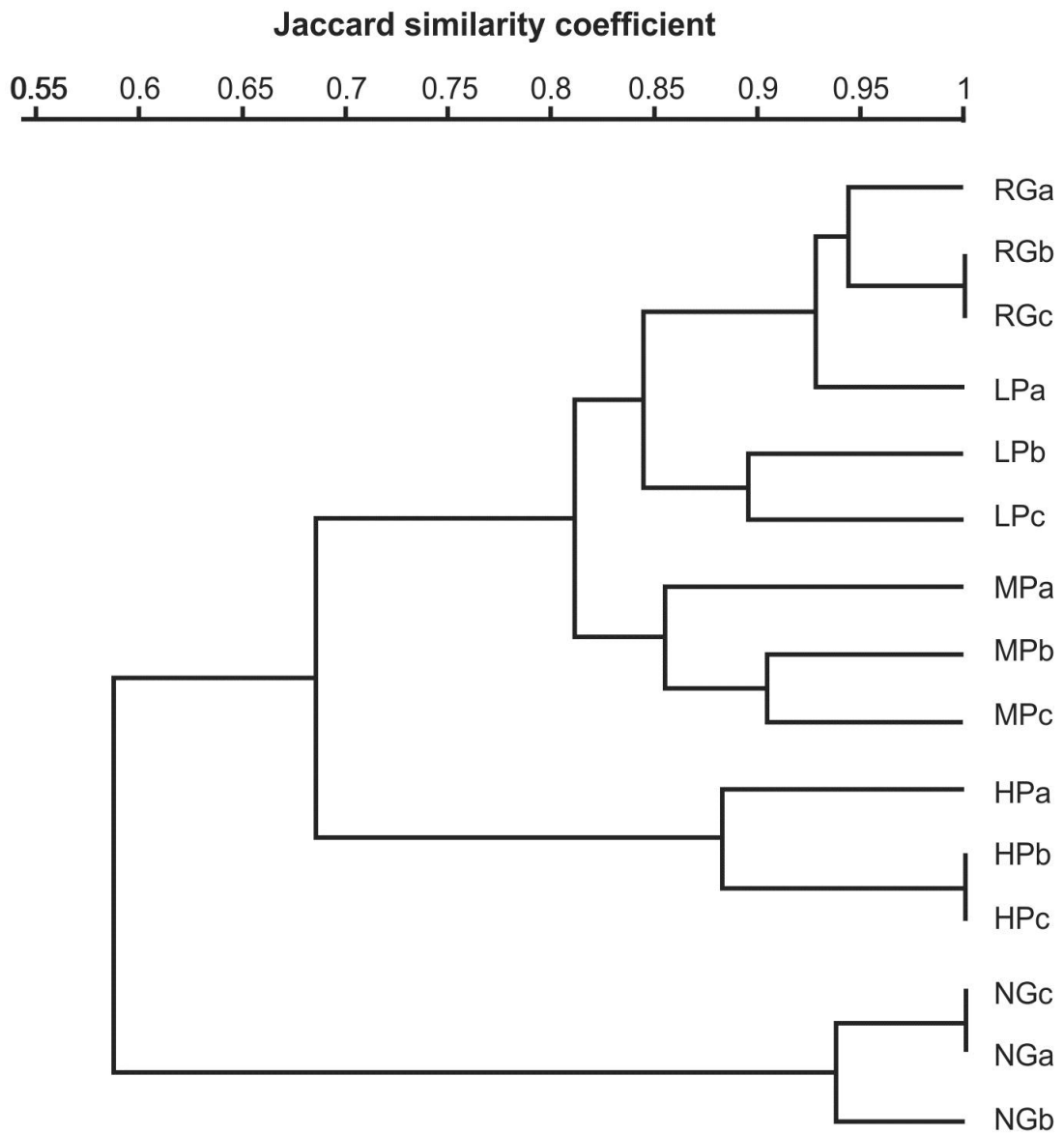
489 *H'* = Shannon diversity index; *D* = Dominance; *J* = Equitability

490 NG = never-grazed native vegetation; RG = regenerated vegetation; HP = high grazing pressure;

491 MP = moderate grazing pressure; LP = low grazing pressure

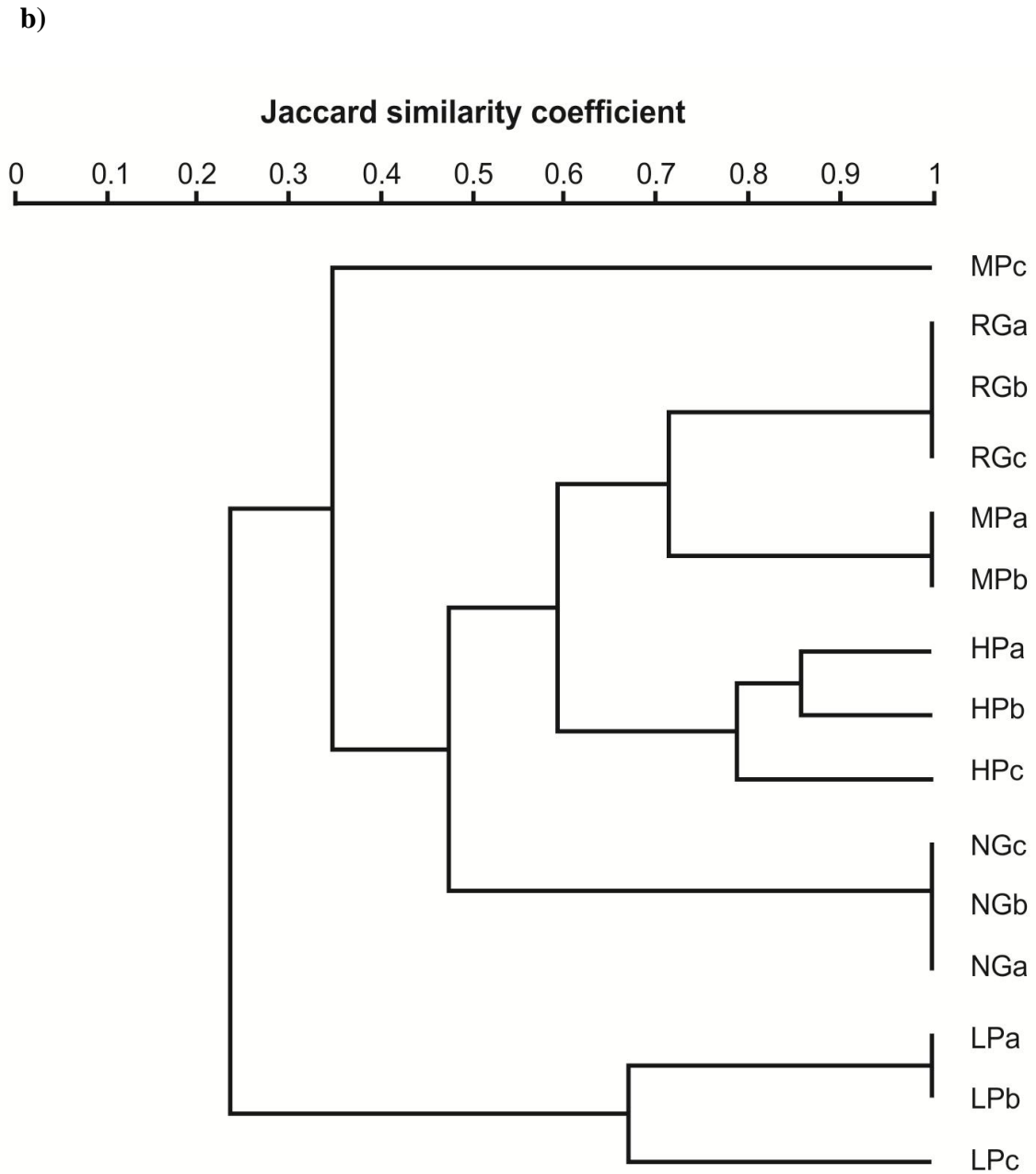
492

493 **Figures**
494
495 **a)**



496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508

509
510



511

512 **Fig. 1** Dendrograms generated from RFLP profiles of the 16S rDNA (a) and nifH genes (b)
513 from DNA isolated from soil under different grazing intensities. NG = never-grazed native
514 vegetation; RG = regenerated vegetation; HP = high grazing pressure; MP = moderate
515 grazing pressure; LP = low grazing pressure

516

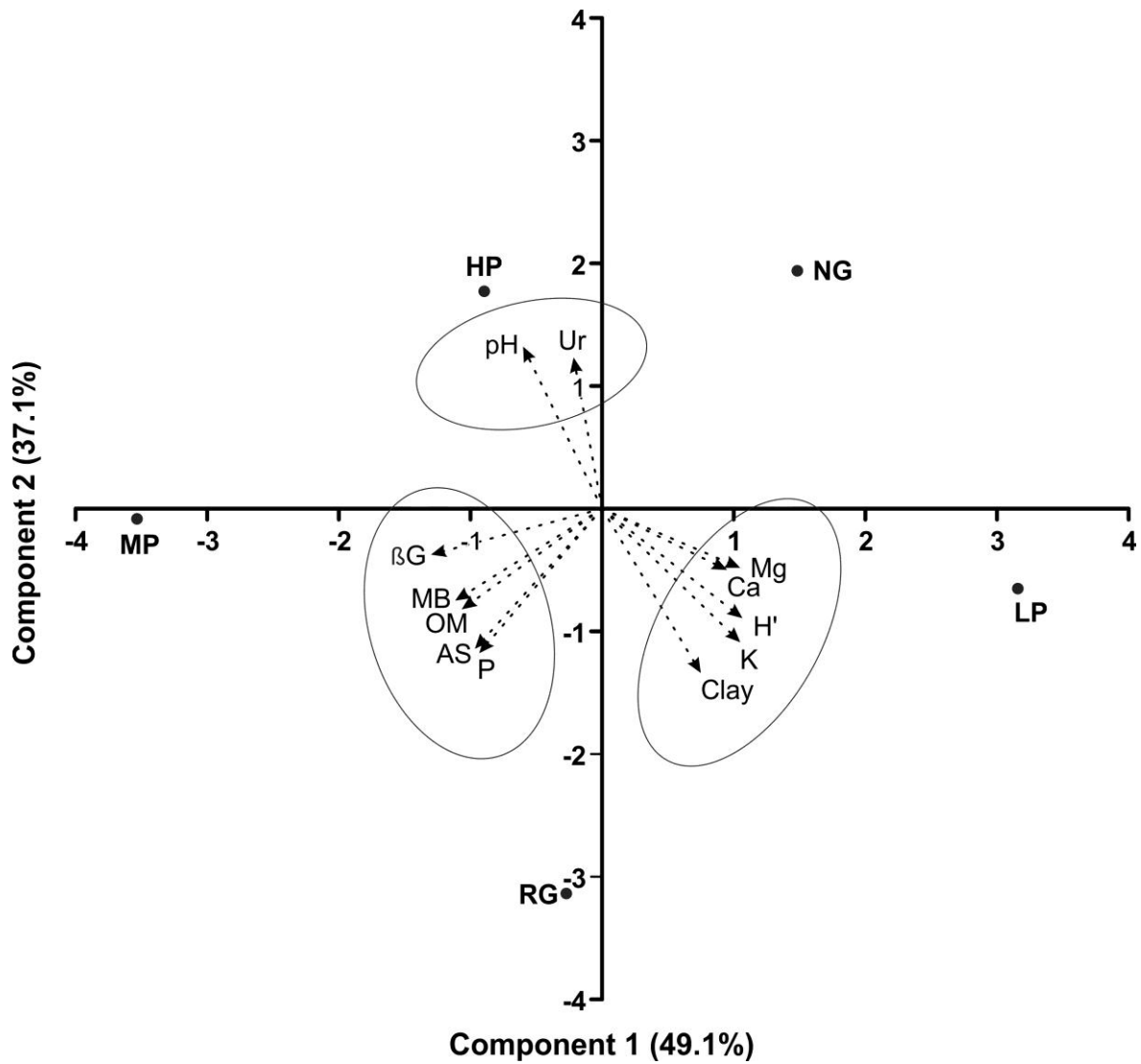


Fig. 2 Principal component analysis of the chemical, biochemical and microbiological characteristics of soil under different grazing intensities. NG = never-grazed native vegetation; RG = regenerated vegetation; HP = high grazing pressure; MP = moderate grazing pressure; LP = low grazing pressure; MB = microbial biomass; AS = arylsulfatase; SSG = β -glucosidase; Ur = urease

4- Conclusões Gerais

- ◇ Presença de animais para pastagem nos campos foi benéfica para a comunidade bacteriana do solo;
- ◇ Intensidades maiores de pastejo, moderado e alto, favoreceram o aumento da biomassa microbiana e a atividade enzimática;
- ◇ O baixo pastejo foi o campo que apresentou maior diversidade de bactérias diazotróficas;
- ◇ Como perspectiva futura, acredita-se que a continuidade do presente trabalho, com a avaliação da comunidade bacteriana por sequenciamento de nova geração (NGS), permitirá uma compreensão mais aprofundada dos efeitos das diferentes intensidades de pastejo sobre a comunidade microbiana em solos sob pastagem nativa no bioma Pampa.

5- Referências Bibliográficas

- Amann, R.I., Ludwig, W. & Schleifer, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59, 143-169. 1995.
- Araújo, E. A. Qualidade do solo em ecossistemas de mata nativa e pastagens na região leste do Acre, Amazônia Ocidental. Tese de doutorado na Universidade Federal de Viçosa, MG. 2008
- Baldani, J.I.; Baldani, V.L.D.; Seldin, L. & Döbereiner, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* nov.sp. a root associated nitrogen fixing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 36:86-93, 1986.
- Bazzicalupo, M.; Okon, Y. Associative and endophytic symbiosis. In: Pedrosa, F.; Hungria, M.; Yates, M.G.; Newton, W.E., eds. *Nitrogen Fixation: from molecules to crop productivity*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, p. 409-413. 2000.
- Berreta, E. Ecophysiology and management response of the subtropical grasslands of Southern America. In: Gomide, J.A., Mattos, W.R.S., Silva, S.C. da (Eds.) *XIX International Grassland Congress, Proceedings...* p.939-946. 2001.
- Bilenca, D. & Miñarro, F. Identificación de áreas valiosas de pastizales en las Pampas y Campos de Argentina, Uruguay y Sur de Brasil. *Fundación vida silvestre*. 323p. 2004.
- Boldrini, I.I. Formações campestres no sul do Brasil: origem, histórico e modificadores. In: *Simpósio de forrageiras e produção animal, 2., 2007, Porto Alegre. Anais...* Porto Alegre, 7-13. 2007.
- Carvalho, P.C.F.; Fischer, V.; Santos, D.T.; Ribeiro, A.M.L.; Quadros, F.L.F.; Castilhos, Z.M.S.; Poli, C.H.E.C.; Monteiro, A.L.G.; Nabinger, C.; Genro, T.C.M. & Jacques, A.V.A. Produção Animal no Bioma Campos Sulinos. *Brazilian Journal of Animal Science*, João Pessoa, v. 35, n. Supl. Esp., 156-202. 2006.
- Cattelan, A.J. & Vidor, C. Flutuações na biomassa, atividade e população microbiana do solo em função de variações ambientais. *Revista Brasileira de Ciência do solo*, Campinas, v. 14, p.133-142, 1990.
- De-Polli, H. & Guerra, J.G.M. Determinação do carbono da biomassa microbiana do solo: método de fumigação-extração. *Seropédica: Embrapa-CNPAB*. 10 p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 37) 1997.
- Dick, R.P.; Breackwell, D.P. & Turco, R.F. Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrative microbiological indicators. In: DORAN, J.W.; JONES, A.J. (eds.) *Methods for assessing soil quality*. Madison: SSSA, p.247-271. (SSSA Special Publication, 49) 1996.
- Doran, J.W. & Parkin, T.B. Defining and assessing soil quality. In: DORAN, J.W. & Coeman, D.C.; Bezdicek, D.F & Stewart, B.A., eds. *Defining soil quality for*

sustainable environment. Madison, Soil Science Society of America, 1994. p.3-21. (SSSA Special Publication, 35)

Gil-Sotres, F.; Cepeda-Trasar, C.; Leirós, M.C. & Seoane, S. Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biology and Biochemistry*, Elmsford, v.37, p.877-887, 2005.

Grisi, B.M. Biomassa e atividade de microrganismos do solo: revisão metodológica. *Revista Nordestina de Biologia*, João Pessoa, v. 10, n. 1, p. 1-22, 1995.

Hartmann, A.A., Kirchhof, B., & Schloter, M.; Direct approaches for studying soil microbes. In: van Elsas J.D.T, Wellington, E.M.H. editor. *Modern soil microbiology*. Dekker, New York. 1997.

Holz, M. Do Mar ao Deserto: A Evolução do Rio Grande do Sul no Tempo Geológico. Editora da Universidade, UFRGS, Porto Alegre. 1999.

Hugenholtz, P., Goebel, B.M. & Pace, N.R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*, 180, 4765-4774. 1998.

IBGE – 2004. Mapa da vegetação do Brasil e Mapa de Biomas do Brasil. Disponível em <http://www.ibge.gov.br>.

Kuss, A.V. Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado. Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, RS, 2006.

Liesack, W.J., Rainey, F.A. Ward-Rainey, N.L. & Stackebrandt, E. Microbial diversity in soil: The need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. In: van Elsas JDT, Wellington J.T., editor. *Modern soil microbiology*. New York. 1997.

Lisboa, B.B. Parâmetros microbiológicos como indicadores de qualidade do solo em sistemas de manejo. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação de Ciências do Solo da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

Lisboa, B.B. Indicadores Microbianos de Qualidade do Solo em Diferentes Sistemas de Manejo. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*. 36:45-55, 2012.

Madigan, M.T., Martinko, J.M. & Parker, J. *Brock Biology of Microorganisms*. 9ª ed. Prentice Hall, Upper Saddle River. 2000.

Matsuoka, M., Mendes, I.C. & Loureiro, M.F. Biomassa microbiana e atividade enzimática em solos sob vegetação nativa e sistemas agrícolas anuais e perenes na região de primavera do leste (MT). *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, 27:425-433, 2003.

Melloni, R., Nóbrega, R.S.A., Moreira, F.M.S., Siqueira, J.O. Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxita, em

- reabilitação. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.28, p. 85-93, 2004.
- Michereff, S. J.; Andrade, D. E. G. T.; Menezes, M. (Eds). *Ecologia e manejo de fitopatogenos radiculares em solos tropicais*. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, p.1-18. 2005
- Millot, J.C.; Risso, D.F. & Methol, R. *Relevamiento de pasturas y mejoramientos extensivos en áreas ganaderas del Uruguay*. Montivideo, MGAP-CHPA. 195p. 1987.
- Moreira, F.M.S & Siqueira, J.O. *Microbiologia e bioquímica do solo*. Lavras: Editora UFLA, 729p., 2006.
- Pace, N.R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 276, 734-740. 1997.
- Palys, T., Nakamura, L.K. & Cohan, F.M. Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. *Int J Syst Bacteriol*, 47, 1145-1156. 1997.
- Pillar, V.D.; Müller, S.C.; Castilhos, Z.M.S. & Jacques, A.V.A. *Campos Sulinos: Conservação e Uso Sustentável da Biodiversidade*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 403p. 2009.
- Rappe, M.S. Giovannoni, S.J. The uncultured microbial majority. *Ann Rev Microb* 57, 369-394. 2003.
- Roesch, L.F., Fulthorpe, R.R., Riva, A., Casella, G. & Hadwin, A.K.M. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *Isme Journal* 1, 283-290. 2007.
- Santana, D.F. & Bahia-Filho, A.F.C. Soil quality and agricultural sustainability in the Brazilian Cerrado. In: *WORLD CONGRESS OF SOIL SCIENCE*, 16., Montpellier, França. Proceedings. Montpellier, ISS, 1998.
- Santos, M.C.; Nussio, L.G.; Mourão, G.B. et al. Nutritive value of sugarcane silage treated with chemical additives. *Scientia Agricola*, v.66, n.2, p.159-163, 2009
- Silva N. L.M; Curi N.; Ferreira M.M.; Lima J. M.; Daniel F. F. Proposição de modelos para estimativa da erodibilidade de latossolos brasileiros. *Revista de Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, v.34, n.12, p.2287-2298, 1999
- Silveira R. B., Melloni R., Melloni E. G. P. Atributos microbiológicos e bioquímicos como indicadores da recuperação de áreas degradadas, em itajubá/MG. *Cerne*, Lavras, v. 12, n. 1, p. 48-55, 2006
- Soane, B.D. & van Ouwerkerk, C. Soil compaction problems in world agriculture. In: *Soil Compaction and Crop Production. Developments in Agricultural Engineering*, 11 (eds B.D. Soane & C. van Ouwerkerk), pp. 1–21. Elsevier, Amsterdam. 1994.

Torsvik V., Goksoyr J., Daae F.L. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* 56: 782-787. 1990.

Trindade, J.K., Comportamento e consumo de forragem de bovinos de corte em pastagem natural complexa. 208p. Tese Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.2011.

Turco, R.F.; Kennedy, A.C. & Jawson, M.D. Microbial indicators of soil quality. In: Doran, J.W.; Coleman, D.C.; Bezdicek, D.F. & Stewart, B.A., eds. *Defining soil quality for a sustainable environment*. Madison, Soil Science Society of America, p.73-90.(Special Publication, 35). 1994.

Vargas, L. K &Sholles, D. Biomassa microbiana e produção de C-CO₂ e N mineral de um Podzólico Vermelho Escuro submetido a diferentes sistemas de manejo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 24, p.35-42,2000.

Zilli, J. E., Rumjanek, N.G., Xavier. G. R., Coutinho, H.L.C. &Neves, M.C.P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. *Cadernos de Ciência & Tecnologia*, Brasília, v. 20, n. 3, p. 391-411, set./dez. 2003

Whitman, W.B., Coleman, D.C. &Wiebe, W.J.Prokariotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci* 95, 6578-6583. 1998.

Woese, C.R. Bacterial evolution.*Microbiol Rev* 51, 221-271. 1987.