



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PEDRO AMARAL FONTES DE SALES

**AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE POUSIO NA RECUPERAÇÃO DE CAATINGA
DESERTIFICADA**

FORTALEZA

2018

PEDRO AMARAL FONTES DE SALES

**AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE POUSSIO NA RECUPERAÇÃO DE CAATINGA
DESERTIFICADA**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Vânia Maria Maciel Melo

FORTALEZA – CEARÁ

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S155a Sales, Pedro Amaral Fontes de.
Avaliação do método de pousio na recuperação de caatinga desertificada / Pedro Amaral Fontes de Sales. –
2018.
41 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,
Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo .

1. Desertificação. 2. Pousio. 3. Caatinga. 4. Microbioma. 5. Solo. I. Título.

CDD 570

PEDRO AMARAL FONTES DE SALES

AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE POUSIO NA RECUPERAÇÃO DE CAATINGA
DESERTIFICADA

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Mirella Leite Pereira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Tallita Cruz Lopes Tavares Normando
Universidade Federal do Ceará (UFC)

FORTALEZA – CEARÁ
2018

Ao micro-organismo que primeiro degradar as
frias carnes do meu cadáver, dedico como
saudosa lembrança este trabalho

AGRADECIMENTOS

Enumerando, na minha cabeça, os agradecimentos a serem feitos nesse trabalho, ficou mais que claro para mim que minha contribuição para esse trabalho foi menor que a daqueles que me ajudaram, e que sem eles, esse trabalho jamais teria acontecido.

Primeiramente, um agradecimento à minha orientadora Vânia, que me deu um norte nessa vida acadêmica, um local para trabalhar que está mais para uma segunda casa e diversas conversas que me esclareceram muitas coisas, tanto na vida acadêmica, quanto em outras esferas da vida (sem falar dos poucos mas muito bem colocados “carões”).

Gostaria também de agradecer à toda a equipe do Lembiotech que sempre proporcionou uma ótima atmosfera de convivência e trabalho e agradecer especialmente a Lara, que me acompanhou em todo o processo de aprender e fazer todos os experimentos realizados nesse trabalho, e a Mirella, que não só dá um apoio imprescindível a todos que passam por perto, mas também foi muito amiga e prestativa durante todo esse período.

Além disso, é essencial agradecer a todos os meus amigos, que vêm de todas as esferas da vida. E também à minha família. Sem eles, as coisas seriam muito mais chatas.

Por fim, também é importante agradecer à UFC e ao CNPq, por proporcionarem os meios pelos quais cheguei a onde estou, e por fazerem parte da minha formação como pessoa e das minhas contribuições para o mundo.

Resumo

A degradação da terra nas regiões áridas, semiáridas e sub-úmidas, caracterizada pela perda das propriedades físicas, químicas e biológicas do solo e da cobertura vegetal, é causada por uma associação de fatores antrópicos e mudanças climáticas. O Ceará tem 80% do seu território sob clima semiárido e já apresenta regiões em desertificação avançada. Várias medidas para a prevenção e mitigação da desertificação na Caatinga são estudadas. Considerando a importância ecológica e socioeconômica do bioma Caatinga, a compreensão da dinâmica da desertificação é imprescindível para o aprimoramento dos esforços para deter sua expansão. Este estudo analisou regiões de Caatinga em Irauçuba-CE em diferentes estados de preservação (nativa, em pousio de 18 anos e desertificada) focando em algumas variáveis edáficas (umidade, pH e teor de matéria orgânica) e averiguando a estrutura das comunidades microbianas por eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), com o intuito de compreender como a desertificação afeta os fatores estudados e averiguar a capacidade restauradora do método de pousio. Os solos mais conservados, das áreas nativas e de pousio, apresentaram maiores riquezas de unidades taxonômicas operacionais (UTOs), bem como a presença de táxons exclusivos. As análises das variáveis edáficas evidenciaram respostas diferentes, com exceção do pH que se manteve estável; o solo em pousio apresentou matéria orgânica compatível ao solo nativo, enquanto sua umidade se manteve similar à Caatinga desertificada. Considerando as análises de diversidade e as variações nos dados edáficos, fica evidente a influência do processo de desertificação sobre a atividade dos microorganismos do solo e ficou sugerida uma possível variação na estrutura do microbioma do solo. Em conclusão, para que se possa plenamente compreender os efeitos da desertificação no microbioma do solo, a associação de técnicas de sequenciamento de nova geração com técnicas de metabolômica será capaz de proporcionar um panorama completo e satisfatório do impacto da desertificação sobre o microbioma da Caatinga.

Abstract

The degradation of arid, semi-arid and sub-humid regions, characterized by the loss of physical, chemical and biological properties of the soil and the vegetable coverage, is caused by an association of anthropic action and climate change. Ceará has 92% of its territory under semi-arid climate and presents regions in state of advanced desertification. Several measures of desertification prevention and mitigation are studied. Considering the ecological and socioeconomical importance of the Caatinga biome, the comprehension of desertification's dynamics it's indispensable for enhancing the efforts to stop its progress. This study analyses regions of Caatinga in Irauçuba-CE in a conservation gradient (natural, fallow for 18 year and desertified) focusing in some edaphic variables (soil humidity, soil pH and soil organic matter) and assessing microbial community's structure by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), with the goal of comprehending how desertification affects the studied variables and how effective fallow is in restoring desertified Caatinga. The results show that the more conserved soils, in the natural and fallow areas, presented a higher richness of operational taxonomic unities (OTUs), as well as the presence of exclusive taxa. The analysis of the edaphic variables shows mixed responses, with exception of soil pH that held stable. The fallow soil presented soil organic matter compatible with the natural Caatinga's soil, while its humidity was similar to the desertified soil. Comparing the diversity analysis to the change in the edaphic variables, the disparity between what is known of the importance of soil composition to the microbiome and what was observed, led us to consider that the community analysis method does not have enough sensibility to assess the changes in a sufficiently precise manner. Thus, in conclusion, we believe that in order to fully comprehend the effects of desertification in the soil microbiome, more refined techniques, such as next generation sequencing, are necessary.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Áreas susceptíveis à desertificação no Brasil (Fonte: Funceme)	12
Figura 2 - Imagens de satélite (Fonte: Google Earth) de uma das áreas de coleta na Fazenda Aroeira, em Irauçuba	19
Figura 3 - Imagens de satélite (Fonte: Google Earth) da segunda área de coleta na Fazenda Aroeira, em Irauçuba	20
Figura 4 - Potencial hidrogeniônico dos solos das três áreas analisadas. Os valores representam média \pm desvio padrão de três medidas independentes	25
Figura 5 - Análise de variância do teor de matéria orgânica das três áreas da Caatinga em estudo	27
Figura 6 - Análise de variância da umidade do solo das três áreas da Caatinga em estudo	29
Figura 7 – Análise de variância da contagem de viáveis das três áreas da Caatinga em estudo	30
Figura 8 - Análise de Componentes Principal indicando o padrão de orientação baseado na variabilidade dos dados abióticos nas áreas de Caatinga nativa (N31, N32 e N33), em recuperação (E11, E12, E13, E31, E32 e E33) e em desertificada (D11, D12 e D31)	32
Figura 9 - Análise de agrupamento por UPGMA dos perfis de PCR-DGGE de Bacteria no solo Nativo, usando o índice de Jaccard	32
Figura 10 - Análise de agrupamento por UPGMA dos perfis de PCR-DGGE de Bacteria no solo em Recuperação, usando o índice de Jaccard	33
Figura 11 - Análise de agrupamento por UPGMA dos perfis de PCR-DGGE de Bacteria no solo Desertificado, usando o índice de Jaccard	33
Figura 12 - Análise de agrupamento por UPGMA dos perfis de PCR-DGGE de Bacteria em todos os solos estudados, usando o índice de Jaccard	33
Figura 13 - Diagrama de Venn com as UTOs identificadas nas áreas em estudo	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores do pH nos solos coletados nas áreas em estudo	24
Tabela 2 - Teor de matéria orgânica nos solos coletados nas áreas de estudo	25
Tabela 3 - Umidade dos solos coletados nas áreas de estudo	27
Tabela 4 - Contagem de células viáveis	29
Tabela 5 - Índices de diversidade das comunidades de <i>Bacteria</i> de amostras de solo de Caatinga em Irauçuba-CE	35

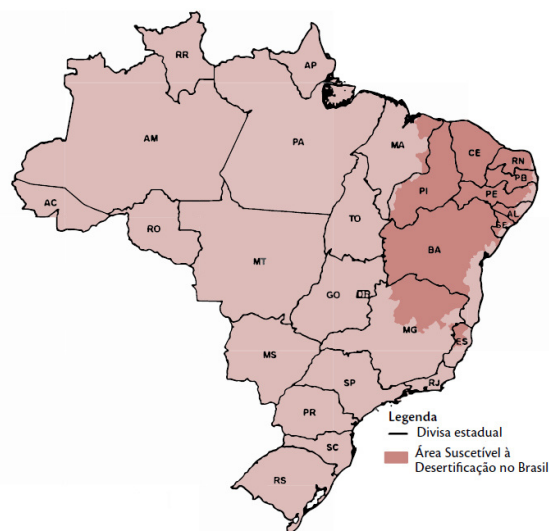
SUMÁRIO

1 Introdução	12
2 Revisão Bibliográfica	14
2.1 Avanço da desertificação na Caatinga	14
2.2 Impacto da desertificação no microbioma do solo	15
2.3 Métodos de estudo da comunidade microbiana	16
3 Objetivos	18
3.1 Objetivos específicos	18
4 Materiais e Métodos	19
4.1 Área de estudo e coleta das amostras	19
4.2 Contagem de viáveis e isolamento de bactérias	20
4.3 Determinação do pH do solo	21
4.4 Determinação do teor de matéria orgânica	21
4.5 Determinação da umidade do solo	21
4.6 Extração de DNA	21
4.7 PCR-DGGE.....	22
4.8 Análise de dados.....	22
5 Resultados	24
6 Discussão	36
7 Conclusão	40

1 Introdução

Desertificação é o termo utilizado para definir a degradação de terras (redução da produtividade biológica ou econômica e de complexidade) sob climas áridos, semiáridos ou sub-úmidos e suas principais causas são mau uso das terras e mudanças climáticas (BESTELMEYER *et al.*, 2015). No Ceará, 92% do território está sob clima semiárido e agora em 2018 registra o oitavo ano consecutivo de seca. O histórico de ocupação e utilização do território cearense apresenta diversos elementos de mau uso da terra (CEARÁ, 2010; REBELLO, 2018), o que confere ao Ceará diversas regiões em processo avançado de desertificação (Figura 1).

Figura 1 – Áreas susceptíveis à desertificação no Brasil (Fonte: Funceme)



A Caatinga, quase que exclusiva ao nordeste brasileiro, ocupa mais de 10% do território nacional e apresenta claro comprometimento da fauna e da flora em áreas sob processo avançado de desertificação (JHONY *et al.*, 2017; PÉREZ-MARIN *et al.*, 2017). Os efeitos da desertificação no microbioma do solo ainda são pouco compreendidos. Os microorganismos além de desempenharem papel importante no desenvolvimento e sobrevivência da fauna e da flora, são responsáveis pelo funcionamento dos ciclos biogeoquímicos, e processos pedogênicos (BALDRIAN, 2017; LLADÓ; LÓPEZ-MONDÉJAR; BALDRIAN, 2017; PONCELET *et al.*, 2014).

Na recuperação de ambientes degradados, uma estratégia comum é o pousio, processo que consiste no isolamento de determinada região, impedindo o acesso de seres humanos e animais de pasto, permitindo que a própria dinâmica do ambiente se encarregue da restauração da área afetada. Entretanto, esse processo demanda tempo e, por não se ter uma

compreensão muito detalhada das comunidades microbianas comuns ao solo da Caatinga, é bastante difícil avaliar o papel que os micro-organismos tem na recuperação e se podem ser indicadores da recuperação.

Desta maneira, torna-se fundamental a compreensão dos efeitos da desertificação sobre o microbioma do solo da Caatinga para que se possa lidar satisfatoriamente com essa problemática. Além disso, a investigação da viabilidade de métodos como o pousio, para o reparo das áreas afetadas, é de extrema urgência.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Avanço da desertificação na Caatinga

Cobrindo 92% do território cearense, a Caatinga é um domínio fitoecológico moldado pelo clima semiárido da região. Nele a baixa precipitação e o alto índice de evaporação contribuem para solos secos, fauna e flora bastante especializados e um ambiente desafiador para a sobrevivência humana (CEARÁ, 2010). Esse regime extremo proporciona um solo com baixa umidade e baixo teor de matéria orgânica (PEI; FU; WAN, 2008; SOUSA *et al.*, 2012). Entretanto, apesar de todas as intempéries naturais, a agropecuária tem sido a principal atividade econômica do território cearense.

Como forma de se adaptar à região, as comunidades locais desenvolveram práticas para maximizar o uso dos recursos naturais. Porém, muitas delas, do ponto de vista da sustentabilidade do uso da terra, são consideradas mau uso. Em parte considerável da Caatinga, o aproveitamento das raras pastagens consiste em permitir a pastagem por bovinos até a exaustão do solo, sendo seguida da pastagem por ovinos e caprinos. Nesse fluxo, os bovinos, com seus hábitos alimentares mais brandos e específicos, exaurem grande parte da pastagem. Entram em cena, então, ovinos e caprinos, de hábitos alimentares mais rústicos e abrangentes, que completam o consumo da escassa cobertura vegetal. Essa sobrepastagem, apesar de otimizar o uso da área de criação, é extremamente danosa à cobertura vegetal, que consiste principalmente de gramíneas, arbustos e árvores com raízes rasas. Portanto, a sobrepastagem é uma das principais causas da desertificação em ecossistemas semiáridos (KALEMA *et al.*, 2015). Essa prática, juntamente outras, como as frequentes queimadas e o extrativismo para produção de carvão, contribuem para a perda da cobertura vegetal, o empobrecimento e a erosão do solo (BESERRA DE OLIVEIRA; LINHARES SALES, 2015). Associado ao clima semiárido e as secas frequentes, o mau uso da terra tem proporcionado um quadro de degradação bastante avançada no território cearense.

A desertificação, nome dado à degradação de regiões áridas, semiáridas e sub-úmidas secas, tem como principal fator de causa, o mau uso das terras (STERK; BOARDMAN; VERDOODT, 2016). Esse mau uso causa a perda da cobertura vegetal do solo que promove a redução do teor de matéria orgânica, resultando em uma capacidade de retenção de umidade consideravelmente reduzida. Dessa forma, há uma erosão exacerbada do solo, com conseqüente remoção de nutrientes e modificação dos ciclos biogeoquímicos (SOUZA, 2000). Essa situação geral, proporciona uma menor possibilidade de usos da terra, diversidade ecológica reduzida e degradação geral do ecossistema.

Nesse contexto, o dano proporcionado pelo mau-uso das terras é amplamente agravado por situações de seca extrema que, por sua vez, é exacerbado pelas mudanças climáticas globais proporcionadas pela ação antrópica. No Ceará, a última seca extrema chegou ao seu sexto ano consecutivo em 2017 (FUNCEME, 2017). Considerando o papel crucial do homem nesse processo, a principal forma de mitigação da desertificação está, principalmente, na redução das práticas de mau uso da terra e, também, no combate ativo aos comportamentos que exacerbam as mudanças climáticas.

2.2 Impacto da desertificação no microbioma do solo

Na literatura, o processo de desertificação aparece mais frequentemente associado aos termos “seca” e “degradação da terra”, que são considerados os dois principais agravantes desse processo (BENLAP, 1995). A principal ferramenta para combater essa forma de degradação ambiental é o gerenciamento adequado do uso dos recursos naturais (PUIGDEFABREGAS, 1998). Entretanto, em parte considerável das terras em uso na Caatinga, há décadas de mau-uso da terra acumuladas (AMANCIO ALVES; DE ARAÚJO; SANTOS DO NASCIMENTO, 2009) e, portanto, alternativas devem ser investigadas, para mitigar o progresso da desertificação já presente na área. Nesse contexto, o pousio é uma técnica amplamente utilizada na recuperação de solos exauridos. O processo consiste em, essencialmente, isolar a área a ser recuperada do contato humano e de animais de pasto e permitir que a própria dinâmica ecológica do ambiente se encarregue da recuperação do meio (SFAIR; BRUNA; LOPES, 2016).

Apesar dos efeitos da desertificação serem muito bem definidos no que diz respeito às variáveis edáficas e, até mesmo, ao seu impacto na cobertura vegetal e na fauna (ARROYO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2017; CHAZDON *et al.*, 2009; PULLA *et al.*, 2015), pouco se sabe sobre seus efeitos sobre a comunidade microbiana, assim como a eficácia do pousio. Por estarem diretamente associados às espécies vegetais e aos processos de ciclagem de nutrientes (BRADFORD; GRANDY; SCHMITZ, 2017; SINGH *et al.*, 2004), os micro-organismos são diretamente relacionados às variações na cobertura vegetal e nas variáveis edáficas (BEVIVINO *et al.*, 2014; FELSMANN *et al.*, 2015; GRIFFITHS; PHILIPPOT, 2013; PRESCOTT; GRAYSTON, 2013; WILL *et al.*, 2010) proporcionadas, também, pelo processo de desertificação. Desta maneira, torna-se imprescindível, para a compreensão e, conseqüentemente, desenvolvimento de formas adequadas de prevenção e mitigação da desertificação, o estudo adequado do efeito que esse processo tem nas comunidades microbianas, principalmente, em um ambiente pouco estudado como a Caatinga.

2.3 Métodos de estudo da comunidade microbiana

Após sua descoberta, o estudo dos micro-organismos se expandiu, e sua importância, foi cada vez mais notada. Desde um papel crucial na ciclagem de nutrientes, até uma influência significativa na nossa saúde, os micro-organismos tem grande importância para o funcionamento de todos os ecossistemas (CHO; BLASER, 2012; HORWATH, 2016). No entanto, devido a difícil reprodutibilidade das condições naturais e das várias interações entre micro-organismos nos meios de cultura, com obtenção de culturas puras a partir de amostras se resumindo a 1% da diversidade microbiana observada, o seu estudo, por muito tempo, foi bastante desafiador. Assim, o surgimento das técnicas independentes de cultivo foi imprescindível para o desenvolvimento da microbiologia, pois possibilitou uma maneira mais compreensiva e fiel de estudar micro-organismos (SCHMIDT, 2006).

As técnicas independentes de cultivo lidam em geral diretamente com o DNA celular e com a heterogeneidade das sequências de nucleotídeos. Frequentemente, os genes correspondentes ao RNA ribossomal (DNAr) são utilizados. Por ser imprescindível para o funcionamento celular, o RNA ribossomal se encontra altamente conservado entre as diferentes espécies de micro-organismos (SU *et al.*, 2012). A subunidade 16S do RNAr é comumente alvo de análises da comunidade procariótica, devido ao seu tamanho, sua ubiquidade nos organismos conhecidos e à presença de zonas de hipervariabilidade, que permitem que essa subunidade seja utilizada como marcador no estudo dessas comunidades (WOESE, 1987).

Na década de 80, com o advento da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR, *polymerase chain reaction* em inglês), o estudo das moléculas de DNA foi bastante facilitado. A técnica consiste na produção de várias cópias de uma molécula de DNA a partir de uma única cópia original. O processo ocorre com a hibridização dos iniciadores (sequências de nucleotídeos) às regiões-alvo seguida pela extensão da região a ser amplificada pelo aparato enzimático. O processo ocorre em ciclos de desnaturação, anelamento e extensão em temperaturas específicas determinadas pelas condições particulares de cada reação (SPIEGELMAN; WHISSELL; GREER, 2005).

As técnicas que se utilizam do DNA amplificado pela PCR são as técnicas de *fingerprinting* e são capazes de possibilitar inferências nos perfis de estrutura e de diversidade de uma determinada comunidade microbiana a partir do produto de uma PCR.

Entre essas técnicas, o gel de eletroforese com gradiente desnaturante (DGGE) utiliza uma matriz de acrilamida/bis-acrilamida com um gradiente desnaturante crescente (ureia e formamida), sob uma corrente elétrica, para separar as moléculas de DNA não a partir do

tamanho, mas a partir da sua composição nucleotídica (proporção de ligações guanina-citosina e ligações adenina-timina). Esse método usa na PCR um iniciador com grampos G-C (cauda de guanina-citosina) para evitar a desnaturação completa das sequencias de DNA. O gradiente desnaturalante rompe as pontes de hidrogênio das ligações nucleotídicas criando perfis de bandas exclusivos de cada amostra. As ligações guanina-citosina têm três pontes de hidrogênio enquanto as ligações adenina-timina têm apenas duas, por isso são mais fortes, assim, a desnaturação das moléculas de DNA no gradiente desnaturalante depende diretamente da proporção ligações guanina-citosina e adenina-timina. As bandas observadas no DGGE representam grupos taxonomicamente similares, denominados unidades taxonômicas operacionais (UTO ou OTU, em inglês). O padrão observado em um DGGE pode ser analisado para se gerar dados para análises estatísticas multivariadas e da estrutura das comunidades em questão (MUYZER; DE WAAL; UITTERLINDEN, 1993).

3 Objetivo Geral

Avaliar se a desertificação do solo da Caatinga afeta as comunidades microbianas e as variáveis abióticas e se o método de pousio possui potencial restaurador a partir da análise da estrutura da comunidade bacteriana.

3.1 Objetivos específicos

- Averiguar o efeito da desertificação nas variáveis edáficas pH, matéria orgânica e umidade do solo, além da variável biológica de unidades formadoras de colônias;
- Averiguar o potencial restaurador do pousio nas variáveis abióticas do solo;
- Avaliar o efeito da variação das variáveis abióticas do solo nas comunidades microbianas;
- Avaliar os perfis de comunidade obtidos, junto com os dados de diversidade, para averiguar a presença de variações na estrutura das comunidades nos solos amostrados.

4 Materiais e Métodos

4.1 Área de estudo e coleta das amostras

A cidade de Irauçuba (3.7476° S, 39.7827° O), situada a 150 quilômetros a oeste de Fortaleza (Ceará), apresenta evidências de susceptibilidade à desertificação. Entre essas, a destruição desordenada da cobertura vegetal, erosão do solo, assoreamento dos rios e barragens, dentre outras (BESERRA DE OLIVEIRA; LINHARES SALES, 2015).

Do território municipal, 12,4% são ocupados por área municipal propriamente dita, 67,1% são dedicados à pecuária e 20,5% são área de mata. Considerando essa divisão, as amostras foram coletadas de quatro áreas distintas: a área de mata intocada, servindo como um exemplar de Caatinga nativa; a área de pastejo, que representa uma Caatinga com grau de desertificação bastante avançado; e as áreas de recuperação natural. Estas últimas, consistem em duas áreas de 0,25 hectares cercadas, há 18 anos, dentro da área de pastejo; portanto foram consideradas como representantes do processo de recuperação natural da Caatinga. Em cada uma das áreas, foram selecionados três pontos aleatórios, e em cada ponto amostras foram coletadas em triplicata na profundidade de 0-20 cm com um amostrador de solo (Figuras 2 e 3).

Ao total, 36 amostras foram coletadas, em março de 2017, para as análises dos dados edáficos e de contagem de viáveis, as quais foram acondicionadas em sacos plásticos. Para análises de PCR-DGGE 33 amostras foram coletadas, sendo acondicionadas em potes de coletas estéreis.

Figura 2 - Imagens de satélite (Fonte: Google Earth) de uma das áreas de coleta na Fazenda Aroeira, em Irauçuba.



Legenda: D11: Amostra de Caatinga desertificada; E11: Amostra de Caatinga em recuperação; E12: Amostra de Caatinga em recuperação; E13: Amostra de Caatinga em recuperação.

Figura 3 - Imagens de satélite (Fonte: Google Earth) da segunda área de coleta na Fazenda Aroeira, em Irauçuba.



Legenda: N31/N32: Amostra de Caatinga nativa; E31: Amostra de Caatinga em recuperação; E32: Amostra de Caatinga em recuperação; E33: Amostra de Caatinga em recuperação.

4.2 Contagem de viáveis e isolamento de bactérias

A estimativa de bactérias heterotróficas, mesófilas, os grupos mais relevantes nas condições naturais do solo, como uma avaliação preliminar da riqueza do microbioma, foi feita através da técnica de contagem de viáveis em placa (*spread-plate*). Para tanto, as amostras foram diluídas em solução de NaCl 0,9% na proporção de 10 g de solo para 90 ml de salina (1:10, m/v). A partir dessa diluição inicial foram preparadas diluições decimais sucessivas até 10^{-6} e cada diluição foi inoculada em placas de Petri contendo o meio ATGE (Agar 1,5%, Triptona 0,5%, Glicose 0,1% e Extrato de levedura 0,25%), em duplicatas. As placas inoculadas foram incubadas em estufa a 37 °C por 48 h.

Após o período de incubação as placas foram analisadas visualmente para selecionar a diluição contendo entre 30 e 300 colônias. As colônias isoladas da diluição selecionada foram contadas, tendo em seguida determinadas a média e desvio padrão para cada área em estudo. Com o valor da média, calculou-se o número de unidades formadoras de colônias (UFC) multiplicando pelo inverso da diluição escolhida, expressando-se o valor final em UFC/g de solo.

4.3 Determinação do pH do solo

O pH de cada amostra foi aferido com auxílio de um pHmetro a partir da solução resultante da diluição de 10 g de solo para 90 ml de salina 0,9% (1:9 m/v) agitada a 150 rpm por 30 minutos.

4.4 Determinação do teor de matéria orgânica

A determinação do teor de matéria orgânica foi realizada de acordo com o protocolo de perda de massa por ignição, definido por (SCHULTE; HOPKINS, 1996). A execução do protocolo consiste em secar 0,5 g de solo em cadinhos de cerâmica à 105 °C por 24h em uma estufa e deixá-los atingir temperatura ambiente em um dessecador. Então, os solos foram incinerados à 550 °C por 4h. A pesagem antes e após a incineração permite o cálculo do teor de matéria orgânica, representado pela diferença entre os dois valores. O cálculo do teor de matéria orgânica (mg/kg) é realizado de acordo com a seguinte equação: $M.O.(mg/kg) = (M_s - M_{pi})/M_s * 1000$. Em que M.O. corresponde a matéria orgânica, M_s corresponde a massa seca e M_{pi} corresponde a massa pós-ignição.

4.5 Determinação da umidade do solo

O procedimento para a determinação da umidade do solo foi uma adaptação do protocolo proposto pelo manual da Embrapa de Métodos de Análise de solo (ELISABETH; CLAESSEN, 1997). O protocolo utilizado consiste na pesagem de 5g de amostra do solo a ser analisado, com a subsequente secagem, em cadinhos de cerâmica, sob temperaturas de 105-110 °C por 24h. Ao serem retiradas da estufa, as amostras eram colocadas em um dessecador até atingirem temperatura ambiente e pesadas. Então, as amostras eram recolocadas na estufa e a pesagem era repetida a cada 1h até que as amostras atingissem peso constante. O cálculo consiste na seguinte equação: $Umidade = 100 * (a-b)/b$. Em que **a** é o peso da amostra úmida e **b** é o peso da amostra seca.

4.6 Extração de DNA

A extração de DNA total de todas as amostras coletadas foi realizada utilizando o kit comercial *Power Soil DNA Isolation Kit* (MO BIO, USA), seguindo o protocolo do fabricante. O protocolo consiste em colocar 0,25g de amostra em tubos contendo microesferas e uma solução de lise, os quais realizam uma lise mecânica e química, respectivamente, das células. O DNA é capturado em uma membrana de sílica, lavado das impurezas presentes na amostra original e eluído da membrana com 100 µL de água livre de DNases. Os *pools* DNA extraídos das amostras foram quantificados em um espectrofotômetro (NanoDrop) e armazenados a -20 °C.

4.7 PCR-DGGE

Para a análise das comunidades por DGGE, as amostras de DNA, foram, primeiramente, submetidas a uma PCR para amplificação da região hipervariável V3 do RNAr 16s (ØVREÅS *et al.*, 1997). A reação foi realizada utilizando os iniciadores 338F GC (5' GCC CGC CGC GCG CGG CGG GCG GGG CGG GGG CAC GGA CTC CTA CGG GAG GCA GCA 3') e 518R (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3'), específicos para o domínio Bacteria. A amplificação foi realizada em um termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf, Alemanha) nas seguintes condições: 95 °C por 5 minutos; 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto; 55 °C 1 minuto e 72 °C por 1 minuto; com um período final de 5 minutos de extensão a 72 °C.

As reações foram realizadas para 30 µL, e foram ajustadas 0,5 pMol de cada um dos iniciadores, 0,2 mM de cada dNTP, 3 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), 0,03U de polimerase, 6 µL de tampão 5x Go Taq (Promega, EUA), 10ng de DNA (volume variável, dependendo da concentração da amostra) e H₂O Mili-Q ultrapura para PCR suficiente para completar os 30 µL totais da reação. Os produtos foram observados em gel de agarose 2% corados com SYBR SAFE (Invitrogen, EUA) em tampão TAE 0,5 x (200 mM de Tris base, 100 mM de ácido acético glacial, 5 mM de EDTA e pH 8,0), utilizando um sistema de fotodocumentação ultravioleta. O marcador de 100 pares de base foi utilizado como padrão para o tamanho de DNA. Os produtos foram separados por gel de eletroforese de gradiente desnaturante (DGGE). Os géis de acrilamida/bis-acrilamida a 8% foram preparados para um gradiente desnaturante de 4 5% a 70% usando uma solução de 100% desnaturante (ureia 7 M e formamida a 40%) e uma solução a 0% (sem ureia ou formamida). A eletroforese correu a 130 V e 60 °C por 16h em um sistema DCode (BioRad, EUA) em TAE 0,5 x (200 mM de Tris base, 100 mM de ácido acético glacial, 5 mM de EDTA e pH 8,0). Após a corrida, o gel foi corado com SYBR GREEN I (Invitrogen, EUA) e fotografado com um sistema de foto-documentação ultravioleta.

4.8 Análise dos dados

Os dados obtidos nas análises das variáveis abióticas do solo foram submetidos a análise de variância (Anova) com pós-teste de Tukey. As análises e todos os gráficos relativos foram feitos utilizando o programa GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, California, USA). Os géis de DGGE foram normalizados e analisados com o programa BioNumerics (Applied Maths, Sint -Martens- Latem, Bélgica), que gerou matrizes de abundância e presença/ausência. Posteriormente, as matrizes foram utilizadas para gerar agrupamentos

hierárquicos, calculados pela distância de Jaccard, com o método de agrupamento UPGMA. A análise de componentes principais dos dados abióticos (PCA) foi realizada utilizando o programa Past 1.0 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

5 Resultados

A tabela 1 e a figura 3 mostram os valores de pH do solo nas amostras coletadas assim como médias e desvios padrões observados. Na tabela, as amostras relativas à Caatinga desertificada estão representadas pela letra D, com o código das triplicatas na sequência. De forma similar, as amostras da Caatinga nativa e as da em recuperação natural estão representadas pelas letras N e E, respectivamente.

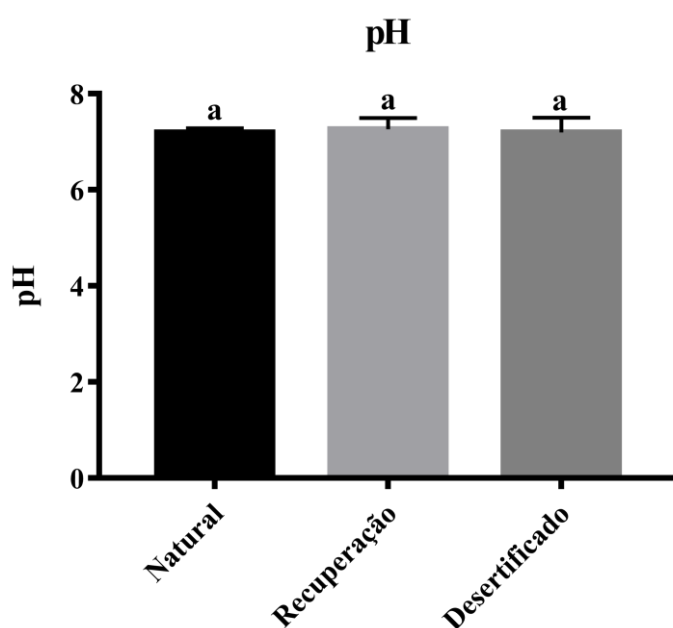
Tabela 1 - Valores do pH nos solos coletados nas diferentes áreas em estudo.

Ponto	pH	Média
D11a	7,13	7,05 ± 0,33
D11b	7,33	
D11c	6,68	
D12a	6,91	7,13 ± 0,31
D12b	7,48	
D12c	7,00	
D31a	7,17	7,42 ± 0,23
D31b	7,62	
D31c	7,46	
E11a	7,32	7,27 ± 0,1
E11b	7,15	
E11c	7,33	
E12a	7,18	7,21 ± 0,2
E12b	7,22	
E12c	7,22	
E13a	7,19	7,22 ± 0,2
E13b	7,24	
E13c	7,22	
E31a	7,20	6,99 ± 0,32
E31b	7,15	
E31c	6,62	
E32a	7,70	7,64 ± 0,04
E32b	7,62	
E32c	7,61	
E33a	7,21	7,24 ± 0,07
E33b	7,33	
E33c	7,19	
N31a	7,24	7,25 ± 0,02
N31b	7,23	
N31c	7,27	

N32a	7,13	
N32b	7,37	7,20 ± 0,15
N32c	7,10	
N33a	7,13	
N33b	7,17	7,15 ± 0,02
N33c	7,16	

Legenda: D: amostras de Caatinga desertificada; E: amostras de Caatinga em recuperação e N: amostras de Caatinga nativa.

Figura 4 - Potencial hidrogeniônico dos solos das três áreas analisadas. Os valores representam média ± desvio padrão de três medidas independentes.



Observando a Tabela 1, percebe-se que o pH apresentou pouca variação entre as áreas coletadas, com valores variando de 6,62 a 7,7, sendo considerado levemente ácido ou neutro. As análises estatísticas ($F=0.33$ e $p=0.71$), indicadas na Figura 4 na forma dos grupos de letras acima dos conjuntos de dados (letras iguais indicam grupos estatisticamente similares), demonstraram que não há diferenças significativas entre o pH das áreas.

A tabela 2 e a Figura 5 mostram os valores relativos ao teor de matéria orgânica (M.O.), com a representação das áreas seguindo o mesmo esquema da tabela anterior.

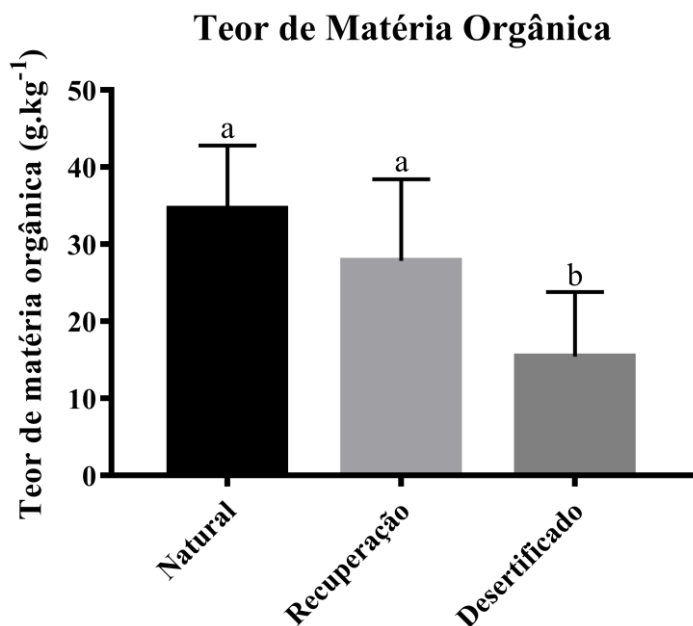
Tabela 2 - Teor de matéria orgânica nos solos coletados nas diferentes áreas de estudo.

Ponto	M.O. (g/kg)	Média
D11a	21,16	
D11b	15,98	19,55 ± 3,10

D11c	21,50	
D12a	16,64	
D12b	-	13,60 ± 4,30
D12c	10,57	
D31a	4,63	
D31b	8,43	7,14 ± 2,17
D31c	8,37	
E11a	25,06	
E11b	22,44	23,20 ± 1,62
E11c	22,09	
E12a	36,12	
E12b	14,36	25,31 ± 10,88
E12c	25,46	
E13a	-	
E13b	19,41	17,32 ± 2,9
E13c	15,23	
E31a	24,52	
E31b	28,30	26,4 ± 2,67
E31c	-	
E32a	44,77	
E32b	40,62	40,28 ± 4,67
E32c	35,44	
E33a	18,36	
E33b	18,38	18,85 ± 0,83
E33c	19,81	
N31a	28,20	
N31b	27,76	29,63 ± 2,86
N31c	32,93	
N32a	42,63	
N32b	45,68	44,20 ± 1,52
N32c	44,30	
N33a	29,96	
N33b	24,58	27,77 ± 2,82
N33c	28,77	

Legenda: D: amostras de Caatinga desertificada; E: amostras de Caatinga em recuperação; N: amostras de Caatinga nativa e (-): valores não obtidos.

Figura 5 - Análise de variância do teor de matéria orgânica das três áreas da Caatinga em estudo.



Observando os resultados acima, vê-se claramente um gradiente que decresce a medida que o solo em questão é mais degradado, entretanto, a análise estatística ($F=9.51$, $p=0.0005$), evidenciada na Figura 3 demonstrou não haver diferença significativa entre o solo natural e o solo em recuperação. No entanto, a análise mostrou que o solo desertificado apresenta um teor significativamente menor de matéria orgânica em relação aos outros solos.

Em seguida, estão os dados relativos aos valores encontrados e à análise realizada no estudo da umidade do solo nas áreas avaliadas (Tabela 3 e Figura 6).

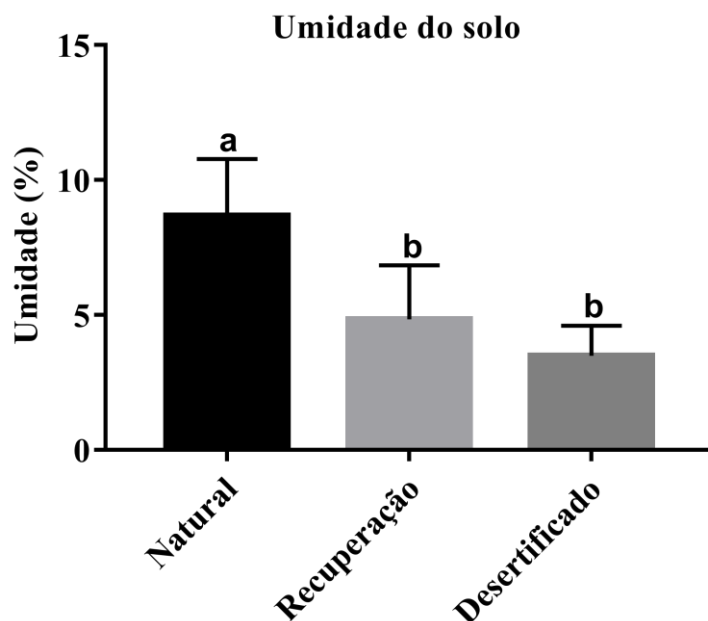
Tabela 3 - Umidade dos solos coletados nas diferentes áreas de estudo.

Ponto	Umidade (%)	Média
D11a	3,21	4,14 ± 0,9
D11b	5,00	
D11c	4,22	
D12a	3,24	2,79 ± 0,63
D12b	-	
D12c	2,34	
D31a	2,16	2,22 ± 0,08
D31b	-	
D31c	2,28	
E11a	8,59	8,62 ± 0,04
E11b	-	

E11c	8,65	
E12a	4,37	
E12b	2,78	4,83 ± 2,31
E12c	7,33	
E13a	-	
E13b	2,39	2,26 ± 0,18
E13c	2,13	
E31a	3,29	
E31b	-	3,80 ± 0,73
E31c	4,32	
E32a	4,22	
E32b	4,63	4,42 ± 0,29
E32c	-	
E33a	4,10	
E33b	3,75	4,20 ± 0,51
E33c	4,75	
N31a	5,56	
N31b	6,85	6,2 ± 0,90
N31c	-	
N32a	-	
N32b	8,10	7,63 ± 0,65
N32c	7,17	
N33a	9,93	
N33b	8,28	9,37 ± 0,95
N33c	9,92	

Legenda: D: amostras de Caatinga desertificada; E: amostras de Caatinga em recuperação; N: amostras de Caatinga nativa e (-): valores não obtidos.

Figura 6 - Análise de variância da umidade do solo das três áreas da Caatinga em estudo.



De forma similar ao teor de matéria orgânica, é possível se observar um gradiente na umidade do solo, que apresenta a menor média no solo desertificado e a maior média no solo natural. Porém, nesse caso, a análise estatística ($F=21.97$ e $p < 0.0001$) agrupou o solo em recuperação junto com o desertificado, ambos estatisticamente distintos da Caatinga nativa.

A Tabela 4 e a Figura 7 trazem os resultados das contagens de bactérias viáveis.

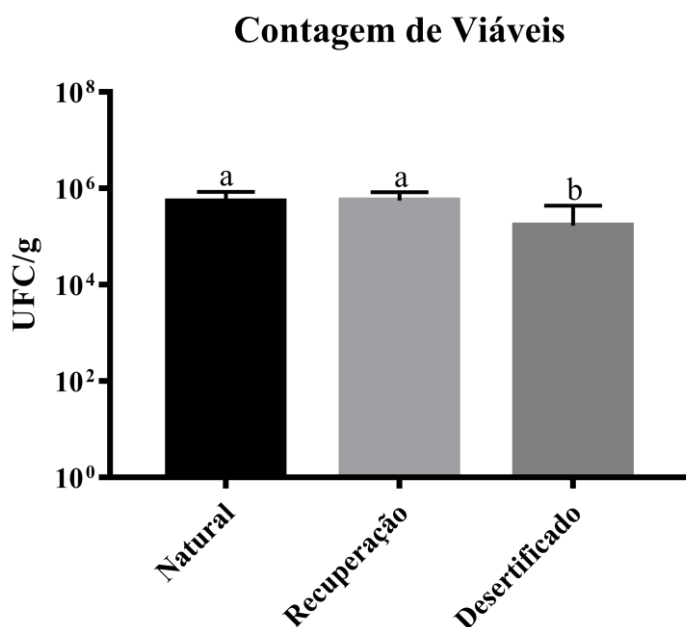
Tabela 4 - Contagem de unidades formadoras de colônias.

Ponto	Unidades Formadoras de Colônia (UFC/g)	Média
D11a	$4,15 \cdot 10^5$	$7,58 \cdot 10^5 \pm 5,90 \cdot 10^5$
D11b	$1,44 \cdot 10^6$	
D11c	$4,20 \cdot 10^5$	
D12a	$1,64 \cdot 10^6$	$2,16 \cdot 10^6 \pm 1,99 \cdot 10^6$
D12b	$4,35 \cdot 10^6$	
D12c	$4,75 \cdot 10^6$	
D31a	$8,3 \cdot 10^4$	$3,99 \cdot 10^6 \pm 5,52 \cdot 10^6$
D31b	$7,90 \cdot 10^6$	
D31c	-	
E11a	$9,15 \cdot 10^6$	$9,52 \cdot 10^6 \pm 8,14 \cdot 10^5$
E11b	$8,95 \cdot 10^6$	
E11c	$1,05 \cdot 10^7$	
E12a	$6,55 \cdot 10^6$	

E12b	3,70*10 ⁶	4,65*10 ⁶ ± 1,64*10 ⁶
E12c	3,70*10 ⁶	
E13a	7,95*10 ⁶	3,52*10 ⁶ ± 3,84*10 ⁶
E13b	1,09*10 ⁶	
E13c	1,53*10 ⁶	
E31a	8,95*10 ⁶	7,48*10 ⁶ ± 2,37*10 ⁶
E31b	8,75*10 ⁶	
E31c	4,75*10 ⁶	
E32a	3,25*10 ⁶	3,52*10 ⁶ ± 0,92*10 ⁶
E32b	2,76*10 ⁶	
E32c	4,55*10 ⁶	
E33a	5,00*10 ⁶	4,20*10 ⁶ ± 1,23*10 ⁶
E33b	3,06*10 ⁶	
E33c	5,35*10 ⁶	
N31a	5,05*10 ⁶	7,20*10 ⁶ ± 2,71*10 ⁶
N31b	1,03*10 ⁷	
N31c	6,30*10 ⁶	
N32a	1,36*10 ⁶	1,97*10 ⁶ ± 1,08*10 ⁶
N32b	3,22*10 ⁶	
N32c	1,33*10 ⁶	
N33a	9,55*10 ⁶	5,99*10 ⁶ ± 3,15*10 ⁶
N33b	4,85*10 ⁶	
N33c	3,57*10 ⁶	

Legenda: D: amostras de Caatinga desertificada; E: amostras de Caatinga em recuperação; N: amostras de Caatinga nativa e (-): valores não obtidos.

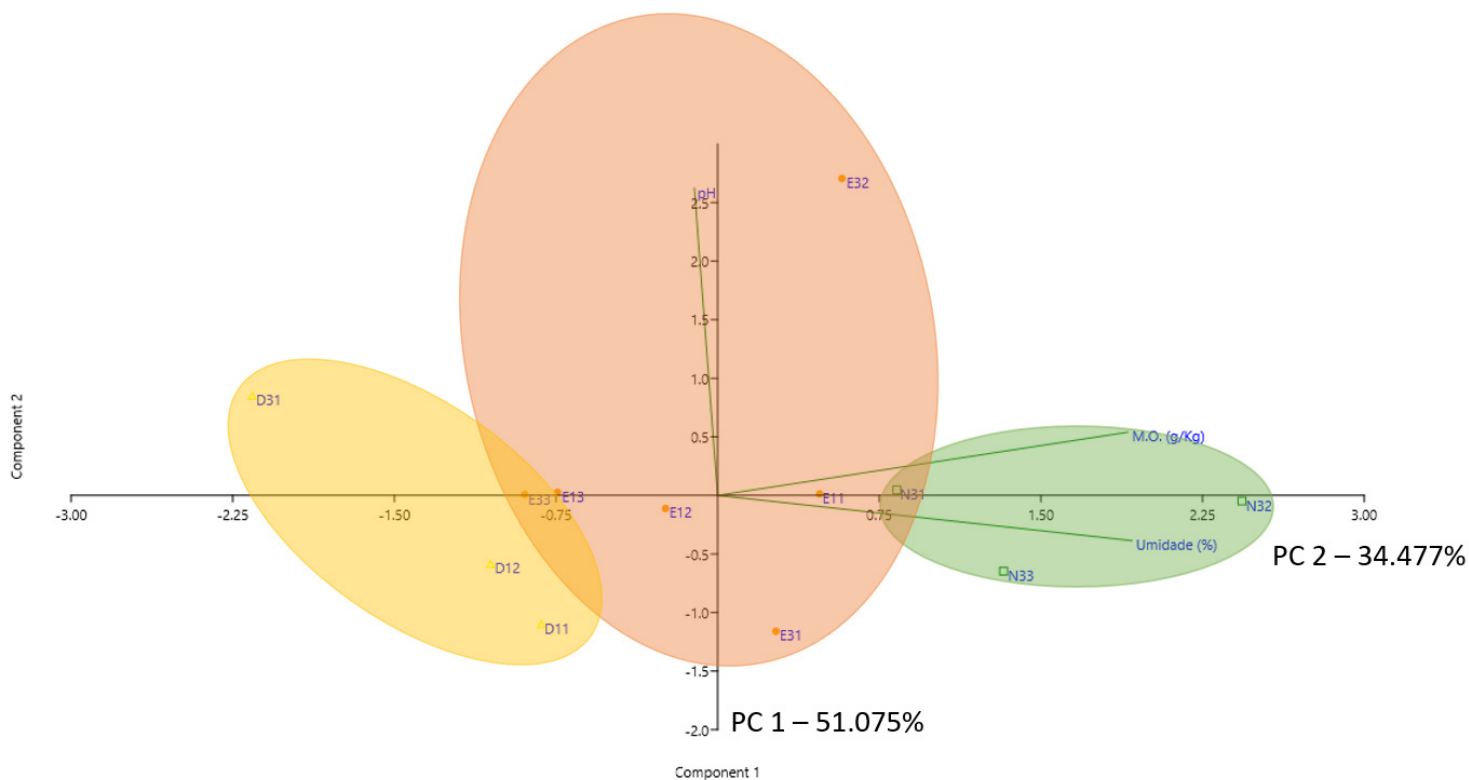
Figura 7 - Análise de variância da contagem de viáveis das três áreas da Caatinga em estudo.



Analisando as contagens, é possível ter uma ideia preliminar da riqueza das áreas em estudo. Como se pode ver pela análise estatística ($F=6.101$ e $p=0.0056$) representada na Figura 7, a quantidade de unidades formadoras de colônias é bastante similar entre a Caatinga nativa e a em recuperação natural, sem apresentarem diferenças estatisticamente significantes. O solo desertificado, no entanto, apresentou uma quantidade de unidades formadoras de colônias significativamente menor.

A análise de variabilidade dos dados abióticos foi feita com uma análise de componentes principais (PCA). O componente principal 1 foi responsável por 51,075% da variação observada nos dados, já o componente principal 2 por 34,477% da variação. Juntos foram responsáveis por aproximadamente 85% da variação observada. O eixo 1 está negativamente correlacionado com o pH ($r=-0.04$) e positivamente correlacionado com a matéria orgânica ($r=0.70$) e com a umidade ($r=0.71$). Já o eixo 2, está negativamente correlacionado com a umidade ($r=-0.14$) e positivamente correlacionado com o pH ($r=0.97$) e com a matéria orgânica ($r=0.20$). Dessa forma, matéria orgânica e umidade destacaram-se como principais fatores de diferenciação das comunidades estudadas, tendo conseguido separar as amostras da área em desertificação das amostras de Caatinga nativa, como pode ser observado na Figura 8.

Figura 8 - Análise de Componentes Principal indicando o padrão de orientação baseado na variabilidade dos dados abióticos nas áreas de Caatinga nativa (N31, N32 e N33), em recuperação (E11, E12, E13, E31, E32 e E33) e em desertificada (D11, D12 e D31).



Os géis de DGGE quando analisados geraram um perfil de bandas que corresponde às unidades taxonômicas operacionais (UTOs) existentes em cada amostra. As imagens a seguir (Figuras 9, 10, 11 e 12) apresentam os dendogramas gerados comparando os perfis de UTOs das amostras estudadas. As amostras foram comparadas tanto dentro dos próprios grupos de estado de conservação quanto comparando os grupos entre si.

Figura 9 - Análise de agrupamento por UPGMA dos perfis de PCR-DGGE de Bacteria no solo Nativo, usando o índice de Jaccard.

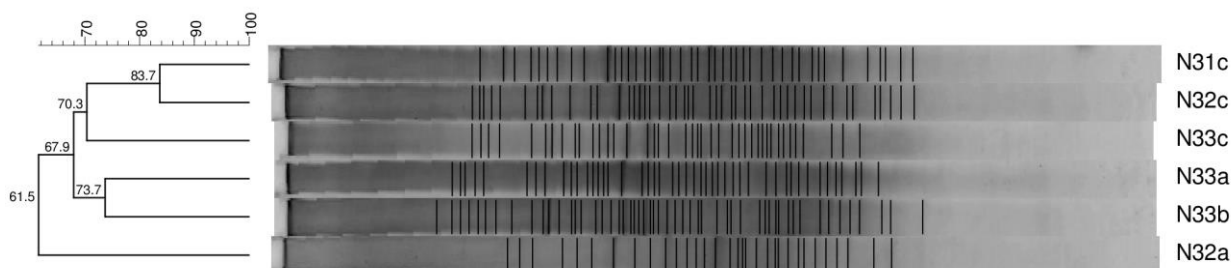


Figura 10 - Análise de agrupamento por UPGMA dos perfis de PCR-DGGE de Bacteria no solo em Recuperação, usando o índice de Jaccard.

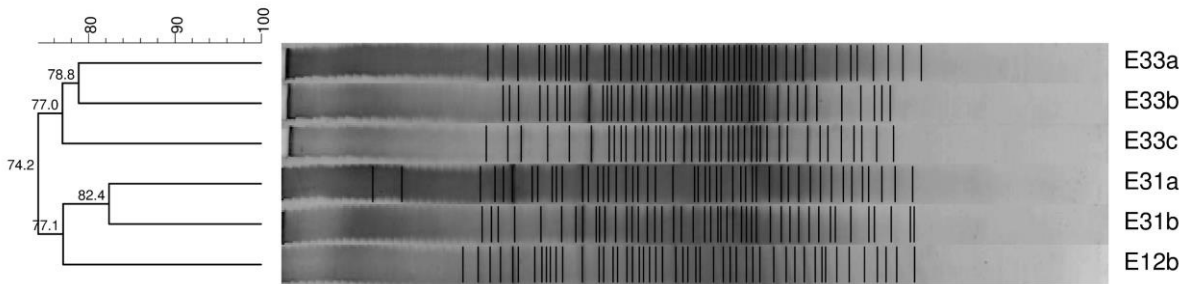


Figura 11 - Análise de agrupamento por UPGMA dos perfis de PCR-DGGE de Bacteria no solo Desertificado, usando o índice de Jaccard.

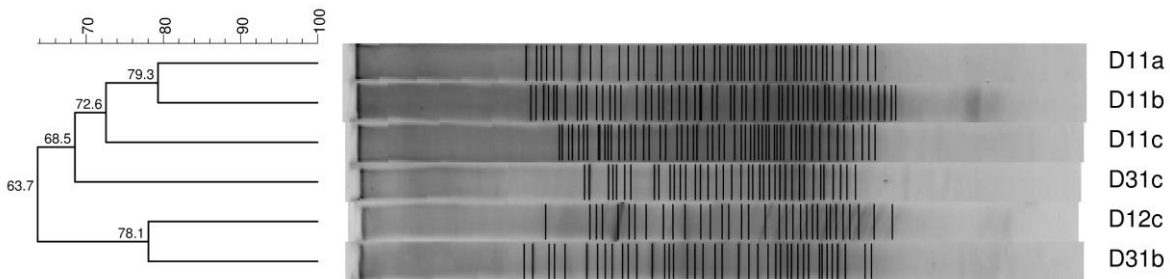
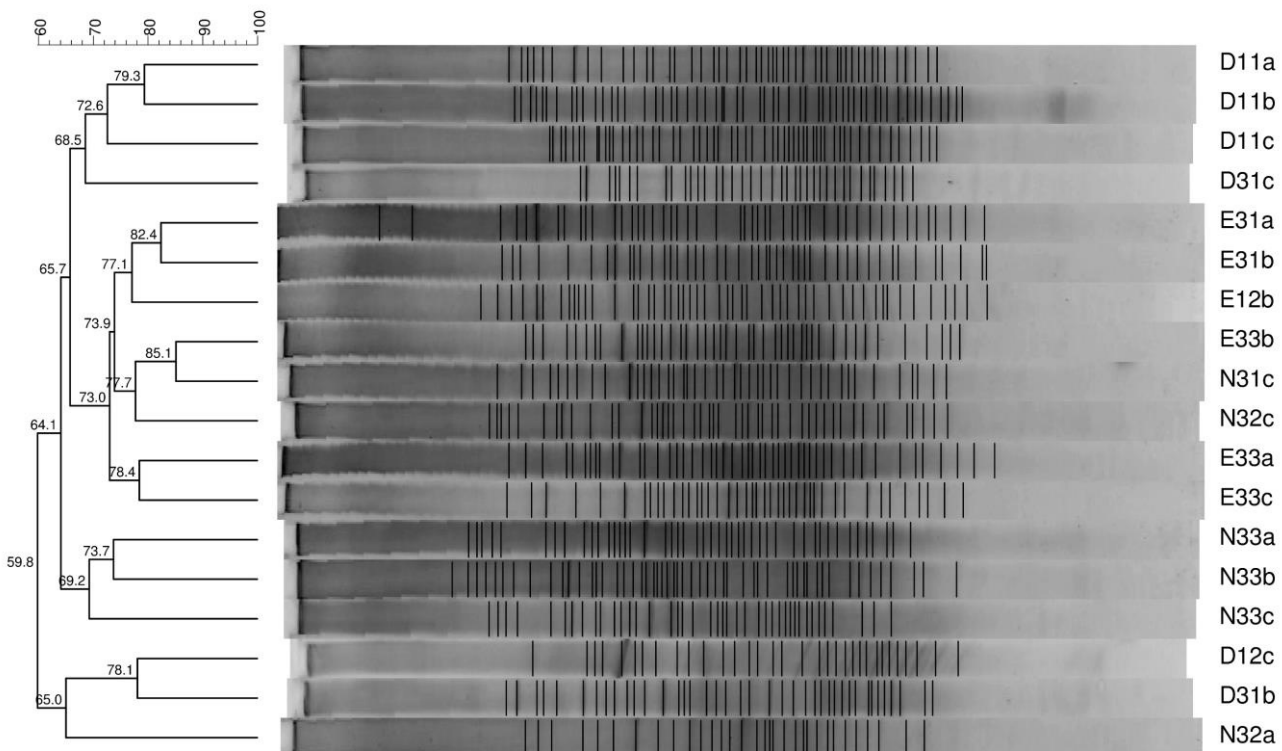


Figura 12 - Análise de agrupamento por UPGMA dos perfis de PCR-DGGE de Bacteria em todos os solos estudados, usando o índice de Jaccard.

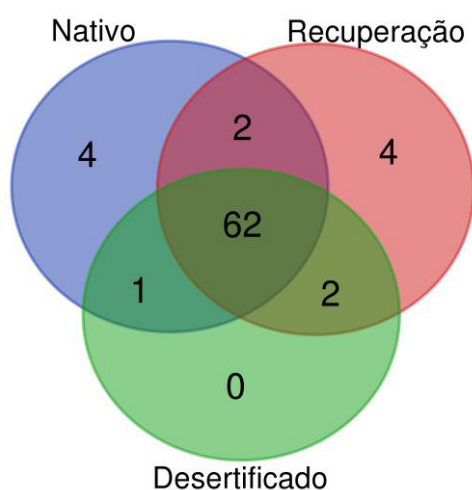


As análises de agrupamento realizadas permitiram observar que independente do estado de conservação, o solo da Caatinga se mantém bastante uniforme no que diz respeito à diversidade. Nas três áreas, todas as amostras apresentaram pelo menos 60% de similaridade. Contudo, analisando as comparações individualmente, observa-se que as amostras em recuperação (pousio) apresentam uma maior similaridade geral (74,2%) entre si enquanto as comparações entre as amostras desertificadas e entre as amostras nativas evidenciam uma similaridade geral menor para esses grupos (63,7% e 61,5%, respectivamente). Isso indica, de maneira geral, uma maior uniformidade das comunidades observadas no solo de Caatinga em recuperação e uma possível diminuição na diversidade durante o processo de recuperação.

Na figura 10 há uma comparação de todas as amostras coletadas, concatenando todas as áreas estudadas. Nessa comparação de diversidade, observa-se uma alta similaridade entre as amostras, com todas tendo pelo menos 59,8% de similaridade. Numa análise mais detalhada, observa-se que as amostras se dividiram em 4 grupos principais. O primeiro, composto por D12c, D31b e N32a, é um grupo de *outliers*, mescla Caatinga nativa e desertificada. O segundo é composto pelas triplicatas da amostra N33(a, b e c). O terceiro engloba as amostras remanescentes do solo desertificado (todas exceto D12c e D31b). O último grupo é um mescla de todas as amostras de Caatinga em recuperação e as amostras remanescentes de Caatinga nativa (N31c e N32c). Na ordem em que foram citados, os grupos apresentam um grau de similaridade entre si crescente.

A comparação da riqueza de UTOs de cada uma das áreas de estudo, permitiu visualizar melhor as diferenças entre elas (Figura 13).

Figura 13 - Diagrama de Venn com as UTOs identificadas nas áreas em estudo.



Como fica evidente na imagem, a maioria (62) das UTOs identificadas é comum às 3 áreas. Os solos nativos e em recuperação apresentam 4 UTOs exclusivas cada e 2 comuns a ambas. O solo desertificado não possui UTOs exclusivas, entretanto possui 1 UTO compartilhada apenas com o solo nativo e 2 UTOs compartilhadas com o solo em recuperação. Ao todo, foram observadas 75 UTOs. O solo em recuperação foi o que apresentou mais UTOs (70), seguido do solo nativo (69) e o desertificado foi o solo com menos UTOs identificadas (65).

As matrizes de presença e ausência geradas pela análise do DGGE permitiram o cálculo dos índices de diversidade das áreas estudadas. Os índices apresentam a quantidade de táxons observados, estimativas de riqueza e cálculos de alfa diversidade. Através desses índices e dos valores de riqueza obtidos, pode-se notar que as três áreas não se diferenciaram bastante em termos de riqueza, apesar das análises de agrupamento obtidas a partir dos perfis de DGGE terem revelado similaridade mínima de 58,9% (Tabela 5).

Tabela 5 - Índices de diversidade das comunidades de *Bacteria* de amostras de solo de Caatinga em Irauçuba-CE.

	S	λ	H'	D _{Mg}
Nativo	69	0,9855	4,234	16,06
Recuperação	70	0,9857	4,248	16,24
Deserto	65	0,9846	4,174	15,33

S: número de táxons observado; λ : diversidade de Simpson; H': diversidade de Shannon; D_{Mg}: riqueza de Margalef

6 Discussão

No núcleo de desertificação de Irauçuba, Ceará, as áreas estudadas variam principalmente na quantidade e composição da cobertura vegetal, observando-se um gradiente decrescente de vegetação da Caatinga nativa para a área em processo de desertificação, ficando o pousio em posição intermediária. Apesar dessas diferenças o pH do solo não foi diferente entre as três áreas, mantendo-se próximo do pH neutro. Sabe-se que o pH é principalmente controlado pela composição mineral básica do solo e, em caso de solos aditivados, pelos fertilizantes utilizados (CHADWICK; CHOROVER, 2001; GHIMIRE; MACHADO; BISTA, 2017), o que explica o resultado encontrado.

O teor de matéria orgânica é significativamente menor na área em processo de desertificação. O pousio favoreceu o aumento do teor de matéria orgânica. De maneira geral, a composição da matéria orgânica é bastante regida pela cobertura vegetal da área e pela fauna envolvida (BAI *et al.*, 2018). Considerando o desmatamento avançado e a pastagem constante de cobertura rala, o baixo teor de matéria orgânica no solo desertificado é compreensível. De maneira similar, o isolamento do solo em recuperação, proporcionou uma restauração visível da cobertura vegetal na área, resultando num aumento considerável do teor de matéria orgânica.

Ao contrário do observado com a matéria orgânica, a análise realizada com os dados relativos à umidade do solo mostra que o solo em recuperação não apresentou aumento na umidade, permanecendo estatisticamente mais similar ao solo desertificado, ambos com umidade significativamente menor que o solo nativo. Assim como a matéria orgânica, a umidade do solo também sofre influencia da cobertura vegetal (GUTIERREZ-LOPEZ *et al.*, 2014), porém, é bem estabelecido que o principal fator ligado a retenção de umidade do solo é a porosidade, a capacidade da rocha de armazenar líquidos no seu espaço interior (NG; GARG; LEUNG, 2015). Essa diferença entre os mecanismos de regulação das duas variáveis pode servir como justificativa para o aumento observado no teor de matéria orgânica não ser acompanhado de um aumento similar na umidade do solo.

Um trabalho relativo à porosidade do solo da mesma região estudada nesse trabalho (BESERRA DE OLVEIRA; LINHARES SALES, 2015) demonstra que não há diferença estatisticamente significativa entre as porosidades do solo em recuperação e desertificado, sugerindo uma possível explicação para a umidade do solo observada. Entretanto, é importante ressaltar que esse mesmo estudo, não analisa a porosidade do solo da Caatinga nativa, tornando inviável uma determinação sólida.

A análise de componentes principais (PCA) realizada com os fatores estudados demonstra um claro gradiente entre os solos estudados. As diferenças observadas, segundo a análise, são principalmente proporcionadas pela matéria orgânica e pela umidade do solo. Essa observação tem especial importância já que ambas variáveis têm influência direta tanto na biomassa quanto na composição das comunidades microbianas do solo (MA *et al.*, 2015; MARTÍNEZ-GARCÍA *et al.*, 2018). Apesar de, no contexto dessa análise, o pH não desempenhe influência tão na distribuição das amostras por não ter variado nas áreas, é válido ressaltar que o pH também apresenta um grande influência na composição das comunidades microbianas do solo e na disponibilidade dos nutrientes (BROOKES *et al.*, 2010; ZHALNINA *et al.*, 2014).

Feitas essas considerações, espera-se que o impacto dos processos estudados nos aspectos da composição dos solos analisados tenha algum impacto na composição das comunidades microbianas presentes. A análise das unidades formadoras de colônias por grama de solo presente nos solos amostrados representa uma forma de averiguar a biomassa de micro-organismos cultiváveis nas amostras. Como se observou, o solo nativo e em recuperação foram estatisticamente semelhantes, enquanto o solo desertificado, apesar de apresentar uma contagem menor, apresentou uma média estatisticamente próxima dos outros.

Essa observação, considerando os resultados obtidos nas outras análises realizadas, sugere que se há uma quantidade similar de micro-organismos nas áreas, mas uma composição diferente dos solos, então as estruturas das comunidades estudadas devem ser compostas por grupos de organismos distintos, com demandas nutricionais diferentes. Porém, técnicas dependentes de cultivo como essa, apresentam diversos problemas já abordados, por isso técnicas mais refinadas foram abordadas.

A observação dos resultados do PCR-DGGE, evidencia um grupo de amostras bastante uniforme, no quesito riqueza de unidades taxonômicas operacionais (UTOs). As análises das diferentes áreas de Caatinga mostraram uma maior similaridade geral nas amostras da área de pousio (74,2%), em comparação aos 61,5% da Caatinga natural e dos 63,7% da Caatinga desertificada, o que indica uma leve variação na homogeneidade das áreas. Entretanto, é importante ressaltar que, a comparação englobando todas as amostras demonstra 59,8% de similaridade entre todos os três tipos de solos estudados e, a partir do cluster mais externo (D12c, D31b e N32a), as amostras apresentam pelo menos 64,1%, maior que a Caatinga nativa ou a Caatinga desertificada apresentam para suas amostras, sugerindo que, no aspecto das UTOs presentes nas áreas em estudo, as amostras são bastante homogêneas.

Um fato importante a ser levado em conta é que esse método, PCR-DGGE, compara as amostras entre si, portanto, o fato de a Caatinga em recuperação ter a maior similaridade geral não significa, necessariamente, que é uma região menos diversa (com menor variedade de grupos observados), mas sim que é uma região mais uniforme (com menos variação entre os pontos coletados). Isso fica bastante evidente a partir dos índices de diversidade e riqueza. Observa-se uma tendência que coloca a Caatinga em recuperação como mais diversa ou rica, seguida pela Caatinga natural e por fim, a Caatinga desertificada (em todos os índices). Vale ressaltar que, apesar da tendência observada, assim como a homogeneidade das amostras, os valores de todos os índices foram muito próximos, sugerindo uma diversidade e riqueza muito similares para as três áreas.

A mesma tendência ficou evidenciada no diagrama de Venn que mostra que, ao todo, foram observados 75 UTOs, 62 das quais são compartilhadas entre as três áreas estudadas (caatinga natural, em recuperação e desertificada). Além disso, demonstra a presença de apenas oito UTOs exclusivos (quatro para a caatinga natural e quatro para a em recuperação), e cinco compartilhados entre duas áreas (duas entre natural e recuperação, duas entre recuperação e deserto e uma entre natural e deserto). Portanto, apesar de esse parâmetro colocar recuperação como o estado com maior número de UTOs, seguido por natural e desertificado, corroborando a classificação por base dos índices de diversidade, as áreas compartilham mais de 80% das UTOs observadas, demonstrando que a composição das comunidades é bastante similar.

De maneira geral, as análises da PCR-DGGE colocaram a Caatinga em recuperação como a área mais diversa/rica e mais homogênea (análise de cluster), seguida pela Caatinga natural e pela Caatinga desertificada, nessa ordem; sendo em homogeneidade, a Caatinga desertificada mais homogênea que a natural. Considerando essas observações, principalmente o fato de as variações observadas serem sutis (tanto da composição de UTOs como nos índices de diversidade e na análise de homogeneidade), há duas explicações para o observado: A primeira explicação é que as variações observadas são sutis, porque a desertificação não afeta a estrutura das comunidades microbianas do solo da Caatinga. A segunda, é que o método de PCR-DGGE é pouco sensível para permitir a observação dos reais efeitos da desertificação no microbioma, sendo a observação obtida desses resultados, limitada pelo método.

Uma colocação importante a ser feita sobre os resultados obtidos, é que a PCR-DGGE utiliza em sua análise DNA total, ou seja, DNA extraído de todos os micro-organismos encontrados na amostra. Isso implica na extração de DNA dos micro-organismos vivos, mas

também dos micro-organismos dormentes ou até mesmo mortos presentes na amostra. Dessa maneira, as análises feitas com os resultados obtidos é incapaz de diferenciar micro-organismos vivos de inativos e, de levar isso consideração nas comparações.

Essa observação abre espaço para a noção de que a variação observada entre solos estudados foi determinada não pela variação nas comunidades microbianas presentes, mas sim pelo nível de atividade dessas comunidades, sugerindo que os 62 táxons compartilhados por todos os solos seriam o núcleo do microbioma da Caatinga.

Considerando as diferenças observadas tanto na umidade do solo quanto no teor de matéria orgânica e a importância dessas variáveis para o desenvolvimento microbiano (NEILSON *et al.*, 2017; PEZZOLLA *et al.*, 2015), a possibilidade de a desertificação não afetar a composição das comunidades microbianas mas sim o nível de atividade dos micro-organismos presentes deve ser considerada. Entretanto, comparando a Caatinga natural com a desertificada, por exemplo, observa-se resultados muito similares para ambas nos índices de diversidade/riqueza, número de UTOs observadas e similaridade geral, entretanto, quando comparados o teor de matéria orgânica e umidade do solo, a Caatinga natural apresenta valores muito maiores que a desertificada. Essa observação sugere que, para que isso aconteça, os perfis dos organismos presentes nesses solos sejam compostos por organismos que utilizam os recursos do ambiente de maneira consideravelmente diferentes (THIELEBRUHN *et al.*, 2012).

Dessa maneira, a melhor forma de justificar os resultados obtidos é considerar que a desertificação apresenta um impacto significativo na atividade dos micro-organismos do solo e possivelmente apresenta um impacto na estruturação do microbioma do solo, mas que o PCR-DGGE por analisar unidades taxonômicas operacionais, que não necessariamente representam unidades filogenéticas e podem englobar diversos táxons (HE *et al.*, 2015) não tem sensibilidade para captar.

7 Conclusão

A análise dos efeitos da desertificação no solo da Caatinga e a averiguação do potencial restaurador do método do pousio demonstrou que, apesar de não exibir efeitos no pH do solo, o processo de desertificação reduz drasticamente o teor de matéria orgânica e a umidade do solo. Foi também observado que, após um período de 18 anos, o método de pousio foi capaz de restaurar satisfatoriamente o teor de matéria orgânica, mas incapaz de restaurar a umidade do solo. As análises de PCR-DGGE mostraram que os processos de desertificação e de pousio, respectivamente, proporcionam uma diminuição e recuperação (chegando a ultrapassar a Caatinga nativa) de todas as métricas de riqueza, abundância e diversidade.

Entretanto, também ficou bastante claro neste trabalho, que solos são sistemas complexos, dependentes da fauna, da flora, dos ciclos biogeoquímicos, do clima e do microbioma. Essa noção é importante para compreender que, apesar de mostrarem uma tendência da dinâmica dos processos estudados, para a real compreensão dos mecanismos envolvidos na desertificação e na recuperação do solo por pousio é necessária uma investigação muito mais abrangente de todos os seus componentes, orgânicos e inorgânicos, para entender extensivamente não só como a fração orgânica do solo responde a essas situações, mas também para averiguar os efeitos na fração mineral e na morfologia do solo.

Além disso, os resultados obtidos sugerem que a desertificação tem grande efeito no nível de atividade dos micro-organismos do solo e possivelmente tem efeitos sobre a estruturação das comunidades. Entretanto, o método utilizado não permite tirar conclusões sobre isso, assim, o desenvolvimento de projetos que envolvam técnicas de sequenciamento de nova geração associadas a técnicas de metabolômica, seriam de grande interesse para fornecer um panorama abrangente sobre como a desertificação de fato afeta o microbioma do solo.

REFERÊNCIAS

- AMANCIO ALVES, J. J.; DE ARAÚJO, M. A.; SANTOS DO NASCIMENTO, S. DEGRADAÇÃO DA CAATINGA: UMA INVESTIGAÇÃO ECOGEOGRÁFICA. *REVISTA CAATINGA*, v. 22, n. 3, p. 126–135, 2009.
- ARROYO-RODRÍGUEZ, V. *et al.* Multiple successional pathways in human-modified tropical landscapes : new insights from forest succession , forest fragmentation and landscape ecology research. v. 92, p. 326–340, 2017.
- BAI, Z. *et al.* Effects of agricultural management practices on soil quality: A review of long-term experiments for Europe and China. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v. 265, n. November 2017, p. 1–7, 2018.
- BALDRIAN, P. Forest microbiome: Diversity, complexity and dynamics. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 41, n. 2, p. 109–130, 2017.
- BENLAP, J. Surface disturbances: their role in accelerating desertification. *ENVIRONMENTAL MONITORING AND ASSESSMENT*, v. 37, n. 1–3, p. 39–57, 1995.
- BESERRA DE OLIVEIRA, J. G.; LINHARES SALES, M. C. *Monitoramento da desertificação em Irauçuba*. 1. ed. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2015.
- BESTELMEYER, B. T. *et al.* Desertification, land use, and the transformation of global drylands. *Frontiers in Ecology and the Environment*, v. 13, n. 1, p. 28–36, 2015.
- BEVIVINO, A. *et al.* Soil bacterial community response to differences in agricultural management along with seasonal changes in a Mediterranean region. *PLoS ONE*, v. 9, n. 8, 2014.
- BRADFORD, M. A.; GRANDY, A. S.; SCHMITZ, O. J. REVIEW AND Applying population and community ecology theory to advance understanding of belowground biogeochemistry. p. 231–245, 2017.
- BROOKES, P. C. *et al.* Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. p. 1340–1351, 2010.
- CEARÁ, S. DOS R. H. *Programa de Ação Estadual de Combate à Desertificação e Mitigação dos Efeitos da Seca, PAE-CE. Ministério do Meio Ambiente/Secretaria de Recursos Hídricos*. Fortaleza: [s.n.], 2010. Disponível em: <<http://geology.gsapubs.org/cgi/doi/10.1130/G30526.1>><http://dx.doi.org/10.1016/j.gr.2009.05.014>><http://link.springer.com/10.1007/978-4-431-53996-4>><http://dx.doi.org/10.1016/j.earscirev.2009.03.004>>.
- CHADWICK, O. A.; CHOROVER, J. The chemistry of pedogenic thresholds. *Geoderma*, v. 100, n. 3–4, p. 321–353, 2001.
- CHAZDON, R. L. *et al.* The Potential for Species Conservation in Tropical Secondary Forests. *Conservation Biology*, v. 23, n. 6, p. 1406–1417, 2009.
- CHO, I.; BLASER, M. J. The human microbiome: At the interface of health and disease. *Nature Reviews Genetics*, v. 13, n. 4, p. 260–270, 2012.
- ELISABETH, M.; CLAESSEN, C. *1997_Embrapa_Analise-Solo*. [S.l: s.n.], 1997.
- FELSMANN, K. *et al.* Soil bacterial community structure responses to precipitation reduction and forest management in forest ecosystems across Germany. *PLoS ONE*, v. 10, n. 4, p. 1–24, 2015.
- GHIMIRE, R.; MACHADO, S.; BISTA, P. Soil ph, soil organic matter, and crop yields in winter wheat-summer fallow systems. *Agronomy Journal*, v. 109, n. 2, p. 706–717, 2017.
- GRIFFITHS, B. S.; PHILIPPOT, L. Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 37, n. 2, p. 112–129, 2013.
- GUTIERREZ-LOPEZ, J. *et al.* Regulation of soil moisture dynamics in agricultural fields using strips of native prairie vegetation. *Geoderma*, v. 226–227, n. 1, p. 238–249, 2014.

- Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2014.02.013>>.
- HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, v. 4(1), n. 1, p. 1–9, 2001. Disponível em: <http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm>.
- HE, Y. *et al.* Erratum to: Stability of operational taxonomic units: an important but neglected property for analyzing microbial diversity. *Microbiome*, v. 3, n. 1, p. 34, 2015. Disponível em: <<http://www.microbiomejournal.com/content/3/1/34>>.
- HORWATH, W. R. The Role of the Soil Microbial Biomass in Cycling Nutrients. *Microbial Biomass*, n. C, p. 41–66, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1142/9781786341310_0002>.
- JHONY, V. *et al.* Phytosociological survey of arboreous species in conserved and desertified areas in the semi-arid region of Paraba, Brazil. *African Journal of Agricultural Research*, v. 12, n. 10, p. 805–814, 2017. Disponível em: <<http://academicjournals.org/journal/AJAR/article-abstract/24D2C5A63080>>.
- KALEMA, V. N. *et al.* The Impacts of Changes in Land Use on Woodlands in an Equatorial African Savanna: Land use Changes in an Equatorial African Savanna. *Land Degradation & Development*, v. 26, n. 7, p. 632–641, 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ldr.2279>>.
- LLADÓ, S.; LÓPEZ-MONDÉJAR, R.; BALDRIAN, P. Forest Soil Bacteria: Diversity, Involvement in Ecosystem Processes, and Response to Global Change. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 81, n. 2, p. e00063-16, 2017. Disponível em: <<http://mmbr.asm.org/lookup/doi/10.1128/MMBR.00063-16>>.
- MA, L. *et al.* Soil moisture and land use are major determinants of soil microbial community composition and biomass at a regional scale in northeastern China. *Biogeosciences*, v. 12, n. 8, p. 2585–2596, 2015.
- MARTÍNEZ-GARCÍA, L. B. *et al.* Organic management and cover crop species steer soil microbial community structure and functionality along with soil organic matter properties. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v. 263, n. January, p. 7–17, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.04.018>>.
- 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, 1993.
- NEILSON, J. W. *et al.* Significant Impacts of Increasing Aridity on the Arid Soil Microbiome. *mSystems*, v. 2, n. 3, p. e00195-16, 2017. Disponível em: <<http://msystems.asm.org/lookup/doi/10.1128/mSystems.00195-16>>.
- NG, C. W. W.; GARG, A.; LEUNG, A. K. Effects of plant roots on soil-water retention and induced suction in vegetated soil. *Engineering Geology*, v. 242, p. 108–120, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.enggeo.2015.04.017>>.
- ØVREÅS, L. *et al.* Distribution of bacteroplankton in meromictic lake Sælenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 63, n. 9, p. 3367–3373, 1997.
- PEI, S.; FU, H.; WAN, C. Changes in soil properties and vegetation following enclosure and grazing in degraded Alxa desert steppe of Inner Mongolia, China. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v. 124, n. 1–2, p. 33–39, 2008.
- PÉREZ-MARIN, A. M. *et al.* Agroecological and social transformations for coexistence with semi-aridity in Brazil. *Sustainability (Switzerland)*, v. 9, n. 6, p. 1–17, 2017.
- PEZZOLLA, D. *et al.* Influence of exogenous organic matter on prokaryotic and eukaryotic microbiota in an agricultural soil. A multidisciplinary approach. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 82, p. 9–20, 2015.

- PONCELET, D. M. *et al.* An assessment of microbial communities associated with surface mining-disturbed overburden. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 186, n. 3, p. 1917–1929, 2014.
- PRESCOTT, C. E.; GRAYSTON, S. J. Tree species influence on microbial communities in litter and soil: Current knowledge and research needs. *Forest Ecology and Management*, v. 309, p. 19–27, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foreco.2013.02.034>>.
- PUIGDEFABREGAS, J. ECOLOGICAL IMPACTS OF GLOBAL CHANGE ON DRYLANDS AND THEIR IMPLICATIONS FOR DESERTIFICATION. *LAND DEGRADATION & DEVELOPMENT*, v. 406, n. 5, p. 393–406, 1998.
- PULLA, A. S. *et al.* Assessing the resilience of global seasonally dry tropical forests. *International Forestry Review*, v. 17, n. 2, p. 91–113, 2015.
- REBELLO, A. *Seca de 2012 a 2017 no semiárido foi a mais longa na história do Brasil*. Disponível em: <<https://noticias.uol.com.br/meio-ambiente/ultimas-noticias/redacao/2018/03/03/seca-de-2012-a-2017-no-semiarido-foi-a-mais-longa-da-historia.htm>>. Acesso em: 19 nov. 2018.
- SCHMIDT, T. M. The maturing of microbial ecology. *International Microbiology*, v. 9, n. 3, p. 217–223, 2006.
- SCHULTE, E. E.; HOPKINS, B. G. Estimation of soil organic matter by weight loss-on-ignition. *Soil Organic Matter: Analysis and Interpretation*, v. 049, n. 46, p. 21–31, 1996.
- SEVERIDADE AUMENTA E SECA PASSA ATINGIR 100% DO TERRITÓRIO DO CEARÁ. FUNCEME. Disponível em: <<http://www.funceme.br/index.php/comunicacao/noticias/827-severidade-aumenta-e-seca-passa-atingir-100-do-territ%C3%B3rio-do-cear%C3%A1>>. Acesso em: 16 nov. 2017.
- SFAIR, C.; BRUNA, E. M.; LOPES, A. V. Land use , fallow period and the recovery of a Caatinga forest. v. 48, n. 5, p. 586–597, 2016.
- SINGH, B. K. *et al.* Unravelling rhizosphere – microbial interactions : opportunities and limitations. v. 12, n. 8, 2004.
- SOUSA, F. P. *et al.* Carbon and nitrogen in degraded Brazilian semi-arid soils undergoing desertification. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v. 148, p. 11–21, 2012.
- SPIEGELMAN, D.; WHISSELL, G.; GREER, C. W. A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 51, n. 5, p. 355–386, 2005. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/w05-003>>.
- STERK, G.; BOARDMAN, J.; VERDOODT, A. Desertification: History, Causes and Options for Its Control. *Land Degradation and Development*, v. 27, n. 8, p. 1783–1787, 2016.
- SU, C. *et al.* Culture-independent methods for studying environmental microorganisms: Methods, application, and perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 93, n. 3, p. 993–1003, 2012.
- THIELE-BRUHN, S. *et al.* Linking soil biodiversity and agricultural soil management. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, v. 4, n. 5, p. 523–528, 2012.
- WILL, C. *et al.* Horizon-specific bacterial community composition of german grassland soils, as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 20, p. 6751–6759, 2010.
- WOESE, C. R. Bacterial evolution. *Microbiological reviews*, v. 51, n. 2, p. 221–71, 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2439888>0A<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC373105>>.
- ZHALNINA, K. *et al.* Soil pH Determines Microbial Diversity and Composition in the Park Grass Experiment. *Microbial Ecology*, v. 69, n. 2, p. 395–406, 2014.