

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Impacto da umidade do solo sobre a estrutura das comunidades
bacterianas e sobre as atividades enzimáticas em solos da
Caatinga e da Mata Atlântica**

Laura Bononi

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2015**

Laura Bononi
Bacharela e Licenciada em Ciências Biológicas

Impacto da umidade do solo sobre a estrutura das comunidades bacterianas e sobre as atividades enzimáticas em solos da Caatinga e da Mata Atlântica

Orientador:
Prof. Dr. **ITAMAR SOARES DE MELO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2015

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Bononi, Laura

Impacto da umidade do solo sobre a estrutura das comunidades bacterianas e sobre as atividades enzimáticas em solos da Caatinga e da Mata Atlântica / Laura Bononi. - - Piracicaba, 2015.

78 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Estresse hídrico 2. Atividade enzimática 3. Alterações climáticas 4. Semiárido
I. Título

CDD 631.46
B719i

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

Dedico

À minha mãe Maria Leonor

Por toda dedicação, amor, incentivo e por acreditar no meu potencial.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Itamar Soares de Melo, pela oportunidade, ensinamentos e orientação!

Ao Dr. Rafael Vasconcellos e Rodrigo Taketani, pelos ensinamentos, amizade e apoio que permitiram a finalização desse trabalho!

Aos meus pais, por acreditarem e me incentivarem sempre a continuar!

À Dra. Cleusa Maria Mantovanello Lucon, pela dedicação, conselhos, ensinamentos e toda força para eu realizar meu mestrado!

Às minha amigas de vida, Marta Alves Moitinho (minha dupla) e Vanessa Abdo, por toda paciência, ajuda, conselhos e tudo mais!

Ao colega Danilo Tosta, pela paciência e dedicação!

Aos meus amigos e familiares!

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Ambiental!

À Patrícia Haddad, Amanda Oliveira e Bruno Evangelista pela amizade e todos os conselhos maravilhosos!

À coordenação da PPG- Microbiologia Agrícola e a Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"!

À Embrapa Meio Ambiente!

Ao CNPq, pela bolsa concedida!

Muito OBRIGADA!

EPIGRAFE

"Determinação, coragem e auto confiança
são fatores decisivos para o sucesso.
Se estamos possuídos por uma inabalável
determinação conseguiremos superá-los.
Independentemente das circunstâncias
devemos ser sempre humildes,
recatados e despidos de orgulho."

Dalai Lama

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| RESUMO | 11 |
| ABSTRACT | 13 |
| 1 INTRODUÇÃO | 15 |
| 2 DESENVOLVIMENTO | 17 |
| 2.1 Revisão Bibliográfica | 17 |
| 2.1.1 Aquecimento Global | 17 |
| 2.1.2 Região semiárida brasileira: bioma Caatinga | 19 |
| 2.1.3 Bioma Mata Atlântica | 20 |
| 2.1.4 Micro-organismos | 21 |
| 2.1.4.1 Micro-organismos do solo e adaptação às condições ambientais | 21 |
| 2.1.4.2 Micro-organismos extremófilos | 23 |
| 2.1.5 Atividade enzimática do solo | 24 |
| 2.1.6 Acesso a microbiota do solo- Técnicas moleculares para análise | 25 |
| 2.2 Objetivos | 26 |
| 2.2.1 Objetivos específicos | 26 |
| 2.3 Material e Métodos | 26 |
| 2.3.1 Área de estudo e coleta das amostras | 26 |
| 2.3.2 Montagem do experimento para avaliação dos ciclos de umidade | 27 |
| 2.3.3 Análise física e química das amostras de solo | 28 |
| 2.3.4 Extração de DNA metagenômico do solo | 30 |
| 2.3.5 Construção da biblioteca de amplicons do gene 16S rRNA de <i>Bacteria</i> | 30 |
| 2.3.6 Quantificação e purificação do produto de PCR | 31 |
| 2.3.7 Avaliação da comunidade microbiana por meio do sequenciamento | 32 |
| 2.3.8 Análise das sequências obtidas | 32 |
| 2.3.9 Atividade enzimática | 33 |
| 2.3.9.1 Atividade da fosfatase ácida e alcalina | 33 |
| 2.3.9.2 Atividade da arilsulfatase | 33 |
| 2.3.9.3 Atividade da desidrogenase | 33 |
| 2.3.9.4 Atividade da celulase e amilase | 34 |
| 2.3.9.5 Atividade da urease | 34 |
| 2.3.9.6 Atividade da fitase | 35 |
| 2.3.9.7 Análises estatísticas | 35 |

| | |
|---|----|
| 2.4 Resultados e Discussão | 36 |
| 2.4.1 Análise da riqueza e diversidade das comunidades bacterianas..... | 36 |
| 2.4.2 Análise da comunidade bacteriana a partir do sequenciamento do gene 16S rRNA | 40 |
| 2.4.3 Atividade enzimática | 47 |
| 2.4.4 Grupos taxonômicos e atributos microbiológicos..... | 54 |
| 2.5 Conclusões / Considerações Finais..... | 59 |
| REFERÊNCIAS | 61 |
| ANEXO | 75 |

RESUMO

Impacto da umidade do solo sobre a estrutura das comunidades bacterianas e sobre as atividades enzimáticas em solos da Caatinga e da Mata Atlântica

As comunidades microbianas regulam a ciclagem de nutrientes no solo. O impacto das mudanças climáticas sobre estas poderia alterar a estrutura, a função e provocar um desequilíbrio dos nutrientes no ambiente. O principal objetivo desse trabalho foi estudar o impacto da umidade sobre a diversidade e atividades enzimáticas das comunidades bacterianas em solos dos biomas Caatinga e Mata Atlântica. Amostras de solo foram coletadas nos seguintes estados brasileiros: Bahia, Pernambuco e São Paulo totalizando quatro pontos de coleta, com um ponto em cada estado e dois pontos no estado de São Paulo. As amostras de solo dos dois biomas, foram incubadas em microcosmos, com três ciclos de umidade (60 %-30 %, umidade relativa) e para cada ciclo de umidade, foram construídas uma biblioteca metagenômica 16S rRNA. Nas análises de alfa diversidade, foram calculados os índices PD (diversidade filogenética baseado nos ramos da árvore filogenética) e Shannon. Para avaliar a beta diversidade foi utilizado o índice Bray-Curtis (índice de similaridade baseado nos grupos dominantes) e a distância UniFrac. Simultaneamente, cada uma das amostras de cada tratamento foi analisada para as seguintes atividades enzimáticas: fosfatase ácida e alcalina, arilsulfatase, desidrogenase, celulase, amilase, urease e fitase. As análises estatísticas incluíram a correlação de Pearson entre as enzimas e as OTUs, ANOVA, LSD e Tukey ($p \leq 0,05$). Os resultados aqui obtidos mostraram que os filos Acidobacteria, Proteobacteria e Chloroflexi foram mais abundantes nos solos da Mata Atlântica e Actinobacteria, Proteobacteria, Chloroflexi e Acidobacteria nos solos da Caatinga, considerando a característica em estudo do efeito adverso do estresse hídrico. As classes mais prevalentes na Mata Atlântica foram Acidobacteria, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria e Gammaproteobacteria. Enquanto que para a Caatinga, as classes prevalentes foram Ktedonobacteria, Actinobacteria-6 e Betaproteobacteria. No que diz respeito ao estresse hídrico sobre as atividades enzimáticas, os dados demonstraram efeito significativo para todos os solos amostrados, exceto para a enzima fitase. Por correlação entre as OTUs e as enzimas observou-se que grupos específicos foram correlacionados positivamente com a atividade das enzimas e com C e N total nos solos estudados. Estes resultados indicam que as mudanças climáticas afetam a distribuição taxonômica das comunidades bacterianas e as funções enzimáticas.

Palavras-chave: Estresse hídrico; Atividade enzimática; Alterações climáticas; Semiárido

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry should be supported by a valid receipt or invoice. This ensures transparency and allows for easy verification of the data.

Additionally, it is noted that regular audits are essential to identify any discrepancies or errors early on. This proactive approach helps in maintaining the integrity of the financial statements and prevents any potential issues from escalating.

The second section focuses on the role of technology in modern accounting. It highlights how software solutions have revolutionized the way financial data is processed and analyzed. Automation of routine tasks not only saves time but also reduces the risk of human error.

Furthermore, the use of cloud-based systems has made it easier for businesses to access their financial information from anywhere, facilitating better decision-making and collaboration between different departments.

In conclusion, the document stresses that a strong foundation in accounting principles is crucial for any business. By adhering to best practices and leveraging technology, organizations can ensure their financial health and long-term success.

It is recommended that businesses invest in training for their staff to stay updated with the latest trends and regulations in the field. This continuous learning approach is key to navigating the ever-evolving landscape of finance.

The final part of the document provides a summary of the key points discussed. It reiterates the importance of accuracy, transparency, and the effective use of technology in accounting.

The document concludes with a call to action, encouraging businesses to take the steps necessary to optimize their financial management processes. By doing so, they can achieve greater efficiency and ensure the long-term sustainability of their operations.

ABSTRACT

Impact of the soil humidity on structure of the bacterial communities and on the enzymatic activities in soils of the Caatinga and Atlantic Forest

The microbial communities regulate the nutrient cycling in the soil. The impact of climate change on could alter the structure and function and cause an imbalance of nutrients in the environment. The main aim of this work was to study the impact of the soil humidity on diversity and enzymatic activities of bacterial communities in the soils of the Biosphere biomes of Caatinga and Atlantic Forest. Soil samples were collected in the following Brazilian states: Bahia, Pernambuco and Sao Paulo totaling four collection points, with a point in each state and two points in São Paulo. The soils samples of the two Biomes, were incubated in microcosms, with three humidity cycles (60% - 30% relative humidity) and for each humidity cycle, was constructed a 16S rRNA metagenomic library. In the analyzes of alpha diversity, the PD indices were calculated (based on phylogenetic diversity branches of the phylogenetic tree) and Shannon and to test the beta diversity we used the Bray-Curtis index (similarity index based on the dominant groups) and the distance UniFrac. Simultaneously, each soil sample of each treatment was analyzed for the following enzymatic activities: acid and alkaline phosphatase, arylsulfatase, dehydrogenase, cellulase, amylase, urease and phytase. Statistical analyzes included the Pearson correlation between enzymes and OTUs, ANOVA, LSD and Tukey ($p \leq 0.05$). The results herein obtained showed that the Phyla Acidobacteria, Proteobacteria and Chloroflexi were more abundant in the soils at Atlantic Forest, and Actinobacteria, Proteobacteria, Chloroflexi and Acidobacteria in the soils of Caatinga, considering the studied trait of the adverse effect of water stress. The most prevalent classes in the Atlantic Forest were Acidobacteria, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria and Gammaproteobacteria. While for the Caatinga, the prevalent classes were Ktedonobacteria, Actinobacteria-6 and Betaproteobacteria. In regard to the hydric stress on the enzymatic activities, the data showed significant effects for all sampling soils, except for the enzyme phytase. By correlations between OTUs and enzymes it was observed that specific groups were positively correlated with the activity of the enzymes and carbon and total nitrogen in the studied soils. These results indicate that climate change affects the taxonomic distribution of bacterial communities and the enzymatic functions.

Keywords: Water stress; Enzymatic activity; Climate Change; Semiarid

1 INTRODUÇÃO

As consequências do aumento da temperatura associados à concentração dos gases do efeito estufa podem trazer impactos para diversas regiões do planeta. No Brasil, 58 % da emissão de gases do efeito estufa tem sido resultado da ação antrópica, devido à mudança no uso da terra, como o desmatamento, atividades agrícolas e queima de combustíveis fósseis. As mudanças climáticas poderão intensificar os períodos de secas no semiárido nordestino, independente do que possa alterar nos níveis de precipitações, já seriam suficientes para causar maior evaporação dos recursos hídricos, além da redução da biodiversidade e impacto na produtividade agrícola. Para a região da Mata Atlântica é previsto a diminuição significativa nos índices pluviométricos para os próximos 100 anos, o que acarretará perda de até 65 % das espécies arbóreas.

Os micro-organismos, a partir da mineralização e da imobilização de nutrientes participam diretamente da ciclagem de nutrientes e contribuem para a manutenção do equilíbrio dinâmico entre a cobertura vegetal e os atributos físicos, químicos e biológicos do solo. A qualidade do solo é a capacidade do solo em sustentar a diversidade biológica, manter a qualidade ambiental e favorecer a saúde das plantas e dos animais. Neste contexto, os micro-organismos do solo, devido à sensibilidade às mudanças ambientais, podem ser utilizados como bioindicadores da qualidade do solo. Alterações no equilíbrio do ambiente edáfico pode alterar a taxa de decomposição da matéria orgânica e, conseqüentemente, a ciclagem de nutrientes. As enzimas do solo estão diretamente relacionadas ao processo de mineralização da matéria orgânica do solo e são sensíveis às oscilações ambientais. Desse modo, são utilizadas para avaliar os impactos de uma perturbação sobre as funções químicas, físicas e biológicas do solo. Os períodos anuais de ciclos de seca seguidos de períodos de chuva são tidos como estresse fisiológico, em que as comunidades microbianas devem possuir mecanismos para os tornarem tolerantes ao efeito da disponibilidade de água. O acesso aos nutrientes se torna limitado quando à medida que a espessura da película da água é reduzida pela seca, em contrapartida, quando a disponibilidade de água aumenta em decorrência da precipitação, provoca uma descarga rápida de nutrientes, aumentando o processo de mineralização no solo pela microbiota.

Estudos realizados visando o efeito das alterações climáticas sobre a microbiota do solo demonstraram que a sazonalidade pode afetar as comunidades microbianas do solo. O aumento no teor da umidade do solo tende a diminuir a decomposição da matéria orgânica, pela baixa concentração de oxigênio no solo. Em contrapartida, quando há um baixo teor de umidade do solo, conseqüentemente, reduz a atividade microbiana através da mobilidade e do potencial de água intracelular. Assim, determinando a estrutura e os padrões de diversidade das comunidades microbianas, por meio da disponibilidade de nutrientes e mobilidade dos micro-organismos no solo. Dessa forma, este estudo teve por objetivo descrever como o impacto da umidade do solo relacionado às mudanças climáticas pode afetar a composição da comunidade bacteriana e as atividades enzimáticas em solos da Caatinga e da Mata Atlântica.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Aquecimento global

As mudanças climáticas globais são consequência do acúmulo de gases do efeito estufa (GEE) na atmosfera, tais como o dióxido de carbono (CO_2), óxidos nitrosos (NO_x) e metano (CH_4). Segundo o Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE - IPCC) a causa desse acúmulo é devido às atividades antropogênicas relacionadas à queima de combustíveis fósseis e o desmatamento de florestas tropicais (SOLOMON et al., 2007). Segundo estimativa do IPCC é de se esperar um aquecimento de 0,1 °C por década. O parecer para um cenário de baixa e alta emissão dos gases é de 1,8 °C e 4,0 °C, respectivamente.

O relato do aumento na emissão do dióxido de carbono, passou de 280 ppm (partes por milhão) para 379 ppm (partes por milhão), entre a Revolução Industrial e o ano de 2005. Para o gás metano, no mesmo ano, foram observados valores de 1774 ppb (partes por bilhão), excedendo os valores registrados durante o início da década de 1990 (1732 ppb). A concentração dos óxidos nitrosos na atmosfera aumentou no mesmo período, de 270 para 319 ppb (IPCC, 2008).

Parte das emissões dos GEE ocorre em decorrência de práticas agrícolas, caracterizando esse setor como um dos responsáveis pelo aumento do efeito estufa. Estima-se que a agricultura seja responsável por 23 % das emissões de GEE de origem antropogênica (CERRI et al., 2004). Esse fato ocorre principalmente pelo desmatamento, mudança do uso da terra, cultivo de arroz irrigado, criação de ruminantes, uso de fertilizantes e pela decomposição da matéria orgânica do solo (MOS), promovida pelas práticas de preparo do solo (LAL et al., 1998; REICOSKY; LINDSTROM, 1993) O metano e o óxido nitroso são os principais gases emitidos pela agricultura, contribuindo com 15% e 6%, respectivamente, para o aumento da emissão desses gases. O cultivo de arroz irrigado, a pecuária doméstica e seus dejetos, assim como a queima de resíduos agrícolas promovem a liberação de metano (CH_4) na atmosfera. Estima-se que 55% das emissões de metano causadas pelo homem são da agricultura e pecuária (IPCC, 1995).

Este processo de modificação climática em escala global tem sérias implicações diretas e indiretas sobre os fatores abióticos (por exemplo, clima e solo) e em todos os níveis tróficos da biodiversidade (POUNDS et al., 2007). Linn e Doran (1984) observaram que em solos muito úmidos a atividade microbiana é limitada pela restrição de O₂. Já Zanchi et al. (2002) mostraram que em condições de seca a atividade microbiana é afetada pela redução da solubilidade do carbono orgânico.

De forma bem simples, o aumento de temperatura induz a uma maior evapotranspiração, ou seja, reduz a quantidade de água no solo, mesmo que as chuvas não diminuam significativamente. Como consequência em longo prazo, este fator poderá desencadear a substituição de espécies dos biomas existentes hoje, por outras mais adaptadas a climas com uma menor disponibilidade hídrica. Por exemplo, as savanas viriam a substituir florestas, a caatinga as savanas e o semi-deserto a caatinga (NOBRE; ASSAD, 2005). Segundo o *United Nations Environmental Programme* (UNEP) a relação precipitação/evapotranspiração indica o índice de aridez, de modo que os valores entre 0,2 a 0,5 sugerem ambientes semiáridos com precipitação medial anual entre 200 a 800 mm (milímetros). Em contrapartida, para as regiões úmidas os valores dessa relação são superiores a 1 com precipitação medial anual superior a 2000 mm. Muitas regiões do globo, além de já serem vulneráveis por sua grande variabilidade natural, podem sofrer com impactos em decorrência das alterações dos padrões climáticos (INSTITUTO NACIONAL DO SEMIÁRIDO - INSA, 2011). Os relatórios do GT1 e GT2 do IPCC relataram que até o final do século XXI, a disponibilidade de água poderá aumentar de 10 a 40 %, nas regiões tropicais, e reduzidas entre 10 a 30 % nas regiões áridas. É de se esperar uma contínua elevação da temperatura próxima a 4,0 °C no decorrer do século XXI.

O relatório do Clima no Brasil (PROBIO- GOF UK-INPE) relatou que a vegetação caatinga pode sofrer alterações tornando-se uma vegetação mais típica de zonas áridas, com predominância de cactáceas. Como consequência das mudanças do clima é de se esperar para a região do Nordeste brasileiro um acréscimo de 3,0 °C; a agricultura se tornaria inviável; o aumento da desertificação causaria diminuição; e por fim, o semiárido tornaria vulnerável a chuvas torrenciais, concentradas em um curto espaço de tempo, e a intensificação de dias secos consecutivos com ondas de calor decorrente do aumento na frequência de veranicos (MARENGO, 2010).

Para as áreas com remanescentes de Mata Atlântica, as projeções mais otimistas e pessimistas do IPCC indicam um aumento de temperatura 2,0 °C ou 4,0 °C, respectivamente. Esses aumentos são suficientes para reduzir a vegetação arbórea em 30 % ou 65 % até 2100, considerando as projeções otimistas e pessimistas, respectivamente (LOPES, 2013).

2.1.2 Região semiárida brasileira: bioma Caatinga

A região semiárida brasileira ou Caatinga ocupa aproximadamente 11 % do território brasileiro totalizando uma extensão territorial de 900,000 km² (BRASIL, 2012). Distribuí-se pelos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e parte de Minas Gerais. Essa região apresenta uma grande riqueza de espécies endêmicas (SÁ; RICHÉ; FOTIUS, 2003).

O nome "caatinga" é de origem Tupi e significa "mata branca" ("Kaa"= Mata, Floresta; "Tinga"= branca) referindo-se à paisagem esbranquiçada, devido ao aspecto das árvores sem folhas durante a estação seca. É um tipo de formação vegetal com características bem definidas, tais como: estrato arbóreo baixo (até 5 m de altura) arbustos e cactáceas. As espécies vegetais possuem raízes por toda a superfície do solo, além de raízes profundas para absorver maior quantidade de água em grandes profundidades durante os rápidos períodos de chuva (GIULIETTI et al., 2006). A caatinga pode ser dividida em hiperxerófila e hipoxerófila.

A caatinga hiperxerófila possui solos relativamente rasos e representa a vegetação predominante de baixo a médio porte. As plantas são classificadas como decíduas com caráter xerófilo (típicas de regiões secas). A caatinga hipoxerófila ocupa predominantemente áreas de solos profundos e relevo plano. São formados em sua maioria por árvores de pequeno a médio porte com troncos retorcidos, vegetação herbácea e arbustos com espinhos (SÁ; RICHÉ; FOTIUS, 2003).

O clima da caatinga é caracterizado por longos períodos de seca devido à escassez de água, irregularidade espaço/temporal e longos períodos de estiagem. A pluviosidade média anual é igual ou inferior a 800 mm, distribuídas ao longo de três a cinco meses. A temperatura média varia entre 23 °C a 27 °C (SUPERINTENDÊNCIA DO DESENVOLVIMENTO DO NORDESTE - SUDENE), podendo chegar a valores maiores que 50°C na estação de verão. Caatinga é um dos mais vulneráveis biomas aos impactos das mudanças climáticas no território brasileiro. O aumento da temperatura global poderá causar um processo de

desertificação da região semiárida (NOBRE, 2011). As reduções nos padrões de precipitação estão presentes na maioria dos modelos globais do IPCC para a região, conseqüentemente, o aumento da temperatura poderá alcançar um valor entre 3,0 °C a 4,0 °C para a segunda metade do século XXI. Assim, causará uma redução entre 15 % a 20 % nas vazões do principal rio da região, o Rio São Francisco (IPCC AR4, 2007).

A ação antrópica tem intensificado as erosões e o aumento no déficit hídrico do solo, devido à perda da cobertura arbustiva (por pastagem, queima e/ou agricultura). A exposição do solo favorece a formação de uma crosta superficial decorrente do impacto direto das gotas de chuva, aumentando o escoamento e reduzindo a infiltração da água (GALINDO et al., 2007). Isso contribui para o processo de desertificação, que junto com as causas naturais, aumentam o processo de desertificação em até 60 % (BRASIL, 2004).

2.1.3 Bioma Mata Atlântica

A Mata Atlântica abrangia uma área em torno de 1.315.460 km² ocupando dezessete estados brasileiros (Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia, Alagoas, Sergipe, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Ceará e Piauí). Atualmente, restam aproximadamente 12,5 % de floresta nativa bastante fragmentada, o que a torna uma das florestas mais ameaçadas do mundo. Todavia, é considerada a terceira maior formação florestal brasileira com enorme importância social e ambiental (VARJABEDIAN, 2010; SOS MATA ATLÂNTICA). O estado de São Paulo possui cerca de 18 % da floresta remanescente no Brasil, que representam 8,3 % dos fragmentos do litoral e encostas da Serra do Mar e 83,6 % da vegetação nativa do estado.

A Mata Atlântica é considerada um hotspot da biodiversidade, incluindo muitas espécies endêmicas. Destacam-se a presença de 20 mil espécies de plantas, aproximadamente oito mil endêmicas; 270 espécies conhecidas de mamíferos (73 endêmicas); 992 de pássaros; 197 de répteis; 372 de anfíbios; e 350 de peixes (METZGER, 2009; SOS MATA ATLÂNTICA). O clima na região litoral do estado de São Paulo é caracterizado por elevado índice pluviométrico, em média os valores variam entre 1.800 e 2.000 mm/ano, podendo alcançar até 4000 mm/ano e médias

de temperaturas mínimas e máximas de 19 °C e 27 °C, respectivamente (MELO; MANTOVANI, 1994).

A exploração da Mata Atlântica começou com a chegada dos portugueses, interessados na extração da madeira do Pau-Brasil. Segundo dados do IBGE, a floresta apresenta alta densidade populacional e polos industriais, o que resulta na fragmentação do habitat e, a redução da sua área ao longo dos anos. Com a Constituição Federal de 1988, a Mata Atlântica junto com outros biomas brasileiros foi definida como patrimônio nacional, tendo seus espaços territoriais protegidos por meio das Unidades de Conservação.

Os solos da Mata Atlântica, em geral, possuem pH ácido, rasos, extremamente úmidos e pobres em nutrientes. Recebem pouca luz, devido ao estrato arbóreo denso e grande quantidade de matéria orgânica. Esse ambiente pode favorecer o crescimento de grupos microbianos decompositores como bactérias e fungos, com importante papel na disponibilização de nutrientes para as plantas (KINDEL; GARAY, 2002).

2.1.4 Micro-organismos

2.1.4.1 Micro-organismos do solo e adaptação às condições ambientais

Os micro-organismos desempenham importantes funções ecológicas no solo, tais como: na transformação e decomposição da matéria orgânica, na ciclagem de nutrientes (ciclos biogeoquímicos) e no fluxo de energia no solo (HERNANI, s.d.). Somam-se ainda o controle biológico de doenças e pragas, biorremediação de poluentes, degradação de agrotóxicos, associações micorrízicas entre fungos e plantas e a fixação biológica do nitrogênio (PARRA, 2002; MENDES; REIS, 2010).

Há diversos estudos sobre a diversidade microbiana em ambientes edáficos (PAULA, 2012; CARVALHO, 2012; KAVAMURA, 2012; SILVA, 2012). Rodrigues (2011) analisou as comunidades bacterianas em solos da Mata Atlântica, e encontraram maior abundância de Acidobacteria, Proteobacteria e Verrucomicrobia. Ferreira et al. (2014) estudaram comunidades bacterianas em solos da Caatinga e observaram uma maior presença dos filos Actinobacteria, Proteobacteria, Acidobacteria e Firmicutes.

A biomassa viva do solo é composta principalmente por fungos, bactérias e arqueias. As bactérias apresentam o grupo mais numeroso (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Essa diversidade é intimamente ligada à variabilidade genética e metabólica

encontrada nesses grupos. Segundo Ranjard et al. (2010) e Blaine (1992) a abundância de bactérias e arqueias no solo varia de 10^7 a 10^{10} células por grama de solo. Os organismos edáficos metabolicamente ativos estão concentrados nas primeiras camadas de solo, entre 1 a 30 cm de profundidade. Estes ocupam menos de 0,5 % do volume total do solo e menos de 10 % da matéria orgânica (ARAUJO; MONTEIRO, 2007). As interações entre as espécies (por exemplo, mutualismo, competição e parasitismo) associadas a fatores ambientais (umidade, temperatura e pH) influenciam na população microbiana presente no solo (OLIVEIRA et al., 2009). Esses fatores levam as comunidades microbianas a se adaptarem rapidamente as variações nas condições ambientais, determinando as atividades que essas desempenharão no solo (KARAMAE et al., 2012). Segundo o mesmo autor os solos são quimicamente, fisicamente e biologicamente heterogêneos, proporcionando uma ampla gama de nichos para as comunidades microbianas.

Fitter et al. (2005), ao estudarem a biodiversidade, o fluxo de carbono e a resiliência do solo concluíram que a riqueza taxonômica é substancial para a resiliência das comunidades diante a mudanças externas, sendo que a microbiota é capaz de manter suas funções, mesmo quando sua estrutura é rapidamente alterada.

Kavamura et al. (2013a), estudaram comunidades bacterianas associadas a cactáceas da Caatinga, durante os períodos de chuva e seca e encontraram maior abundância de Gram-negativas no período chuvoso e de Gram-positivas no período de seca, formados por grupos de micro-organismos que possuem características fisiológicas de resistência aos períodos de seca e chuva. Frossard, et al. (2015), em um estudo no Deserto do Namib, concluíram que as estruturas das comunidades microbianas podem ser alteradas pelos sucessivos ciclos de umidade, e que as atividades dos micro-organismos do solo devem se adaptar as alterações de umidade, sugerindo redundância funcional das comunidades microbianas.

As respostas das comunidades microbianas às variações de seca e chuva são bastante complexas. Em regiões em que o período de seca é extremamente longo, a primeira precipitação pode estimular grupos da comunidade do solo de modo a aumentar a decomposição do C orgânico e a taxa de CO_2 , (BRODIE et al., 2007; VARGAS et al., 2012). Em solos em que a disponibilidade de água é baixa, as comunidades microbianas detêm de mecanismos adaptados a essas condições e uma diminuição na atividade microbiana (PLACELLA et al., 2012). A resiliência faz

com que as comunidades sob efeito de estresse hídrico alterem os grupos sem alterar suas funções (TAKETANI et al., 2014). Portanto, os micro-organismos são de grande importância para a manutenção do equilíbrio biológico e nutricional dos solos, pois podem ser capazes de se adaptar às condições ambientais decorrentes das mudanças climáticas.

2.1.4.2 Micro-organismos extremófilos

O termo “extremófilo” foi primeiramente empregado por MacElroy em 1974, para se referir a organismos que se desenvolvem em condições que poderiam ser letais a outros organismos. A maioria dos micro-organismos extremófilos está presente em dois grandes Domínios da vida, *Bacteria* e *Archaea*.

A variedade de ambientes nos quais esses organismos podem se proliferar é determinada por extremos de temperatura, salinidade, pH, radiação e baixa disponibilidade de água. Assim sendo, denominam-se os micro-organismos extremófilos os que sobrevivem a temperaturas maiores que 45 °C (termófilicos) e menores que 20 °C (psicrofilicos); pH elevado (alcalófitos) e pH baixo (acidófilo); alta concentração de sal, maiores que 20 % (halofílicos); os micro-organismos resistentes a radiação (SANTOS, 2001) e os que sobrevivem a baixa atividade de água (xerófilicos ou xerotolerantes). Os organismos xerófilicos sobrevivem somente em baixa atividade de água e os xerotolerantes são resistentes a essa condição (HOFFMANN, 2001). Segundo o mesmo autor o grupo pertencente ao Domínio *Bacteria* são os micro-organismos mais exigentes à disponibilidade de água no ambiente.

São poucos os estudos que buscam conhecer as comunidades de micro-organismos extremófilos. Garrido et al. (2012) encontraram maior abundância dos filos Actinobacteria, Proteobacteria e Acidobacteria ao estudarem o solo da rizosfera de plantas de cactos do México. Kavamura et al. (2013a) estudaram a diversidade bacteriana na rizosfera de *Cereus jamacaru*, durante o período chuvoso e de seca. O filo que apresentou a maior frequência foi Proteobacteria nas amostras de solo do período chuvoso; e o filo Actinobacteria para as amostras de solo do período de seca. Bachar et al. (2010) observaram que em ambiente semiáridos o filo que mais se destacou foi Acidobacteria, no entanto quando estudaram ambientes áridos três grupos com maior abundância Cyanobacteria, Thermomicrobia, e Verrucomicrobia.

Deste modo, os estudos das comunidades de micro-organismos extremófilos em ambientes secos são importantes, em que esses se encontram adaptados a condições que outros grupos microbianos não estão adaptados (altas temperaturas, radiação UV e baixa umidade). Tendo em vista as mudanças no clima, esses grupos provavelmente poderão sofrer alterações na sua estrutura e função em relação aos impactos da alteração da umidade no solo.

2.1.5 Atividade enzimática do solo

A atividade biológica no solo pode ser definida como toda reação bioquímica catalisada pelos organismos. As atividades enzimáticas estão relacionadas aos micro-organismos responsáveis por tal atividade. As enzimas participam da ciclagem de nutrientes ao catalisarem a mineralização de moléculas complexas em nutrientes que serão assimilados por outros organismos (TABATABAI, 1994).

As enzimas mais comumente analisadas estão envolvidas nos ciclos dos principais elementos do solo como C, N, P e S, tais como fosfatase, sulfatases, urease e desidrogenase. Essas enzimas têm sido utilizadas para entender os processos ecológicos envolvidos com alteração da comunidade vegetal e das características físicas, químicas e biológicas do solo (SALAZAR et al., 2011; VASCONCELLOS, 2012; ARAÚJO, 2007).

As fosfatases ácida e alcalina são responsáveis pela disponibilização de P para as plantas. São classificadas em ácidas ou alcalinas de acordo com a atividade ótima em pH ácido (6,5) e alcalino (11). A fosfatase alcalina é produzida basicamente por micro-organismos e a ácida tanto por micro-organismos quanto por plantas e outros organismos edáficos (TABATABAI, 1969).

O enxofre é disponibilizado para as plantas através da produção de sulfatases, enzima responsável pela liberação de sulfato no solo (SO_4). Dentre as classes de sulfatase, a que é amplamente estudada é a arilsulfatase, responsável por 40 % a 70 % do enxofre total disponibilizado em muitos ambientes.

A desidrogenase ocorre apenas em células vivas estando relacionada com os processos que ocorrem na cadeia transportadora de elétrons. O papel dessa enzima está relacionado à oxidação da matéria orgânica do solo. Todavia, é sensível aos manejos sobre o solo, sendo adequada para avaliar mudanças na qualidade do solo. Porém pode ser utilizada como indicador da população microbiana viável do solo (CASIDA et al., 1964; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A urease participa do ciclo do N, liberando N inorgânico. Catalisa a hidrólise da uréia liberando CO₂ (gás carbônico) e NH₃ (amônia) na natureza. É amplamente distribuída nos ambientes e foi detectada em micro-organismos, plantas e animais (DICK et al., 1996).

2.1.6 Acesso a microbiota do solo- Técnicas moleculares para análise

O maior obstáculo encontrado por pesquisadores no estudo da biodiversidade do solo é que a maioria dos organismos não é identificável por taxonomia morfológica convencional. As técnicas dependentes de cultivo envolvem a identificação de bactérias e fungos através da obtenção de carbono e energia, as exigências nutricionais e meio de cultura para seu crescimento (KENNEDY, 1999). Todavia, essas técnicas fornecem informações limitadas sobre a microbiota, uma vez que aproximadamente, 99 % da microbiota do solo ainda não foram acessadas por métodos dependentes de cultivo.

Os avanços tecnológicos das técnicas moleculares facilitam o acesso à microbiota por métodos independentes de cultivo. Geralmente, as técnicas se baseiam no sequenciamento do DNA dos micro-organismos. A maioria dos estudos utilizam marcadores filogenéticos, como o gene 16S rRNA para procariotos e 18S rRNA pra eucariotos, para avaliar a diversidade taxonômica de um determinado ambiente (HE et al., 2008). O impulso para utilização dessas técnicas foi o desenvolvimento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), que permite amplificar pequenas regiões de interesse do genoma (SAIKI et al., 1985).

Na última década, o estudo da microbiologia ambiental utilizando métodos independentes de cultivo permitiu o estabelecimento de estudo do metagenoma. Amostras do DNA ambiental são extraídas, amplificadas a região de interesse, por exemplo, o gene 16S rRNA para bactérias. Segundo Hubert et al. (2009) os organismos influenciam e são influenciados por fatores ambientais ao produzir compostos químicos resultantes de seu metabolismo. Mathur et al. (2007) estudou os efeitos de fatores abióticos sobre a diversidade filogenética de comunidades bacterianas em fontes termais. O autor utilizou o sequenciamento em larga escala do gene 16S rRNA para o estudo da diversidade bacteriana. Halsey (2012) observou através de diferentes técnicas moleculares a diversidade bacteriana associada a cogumelos da Mata Atlântica. Pacchioni (2010) comparou através da metagenômica amostras de solo de regiões da Mata Atlântica e Caatinga.

Associada a esses estudos estão as ferramentas de bioinformática, combinando ciência da computação, informática, matemática, química, biologia e estatística para compreender a complexidade dos dados gerados no estudo da ecologia (MARTINS, 2009). Contudo, os pesquisadores têm a sua disposição bancos de dados para armazenar uma gama de volume de informação e algoritmos para manipular dados produzidos em larga escala (HAGEN, 2000).

2.2 Objetivos

Considerando o cenário de mudanças climáticas descritos anteriormente, este trabalho teve como objetivo estudar os impactos dos ciclos de umidade sobre a diversidade das comunidades bacterianas e sobre as atividades enzimáticas em microcosmos compostos por solos da Caatinga e da Mata Atlântica.

2.2.1 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos do ciclo de umidade sobre as comunidades de *Bacteria*;
- Avaliar a interação entre os ciclos de umidade e a atividade das enzimas fosfatase ácida e alcalina, arilsulfatase, desidrogenase, celulase, amilase, urease e fitase nos solos de Caatinga e Mata Atlântica.
- Encontrar relação entre os atributos microbiológicos e os grupos taxonômicos de acordo com o ciclo de umidade.

2.3 Material e Métodos

2.3.1 Área de estudo e coleta das amostras

Foram coletadas amostras de dois ecossistemas contrastantes no que tange a pluviosidade, a Caatinga e a Mata Atlântica. Sendo o primeiro com baixo índice pluviométrico e o segundo com alto. Os locais de coleta dos solos pertencentes ao bioma Caatinga estão situados nos Estados da Bahia (BA) e Pernambuco (PE); e ao bioma Mata Atlântica localizada no Estado de São Paulo (SP), totalizando quatro pontos de coleta (Figura 1).



Figura 1 - Mapa do Brasil com destaque para os Estados de Pernambuco, Bahia e São Paulo, onde estão ilustrados os pontos de coleta: (A) Petrolina- CEC, 09°23'36.67"S 40°24'44.89"W; (B) Mandacaru- CAM, 09°03'35"S 40°18'41.88"W; (C) Bertioga- MAB, 23°43'24.0"S 46°01'51.3"W e (D) Cananéia- MAC, 24°53'24.0"S 47°50'39.0"W

Os dados relacionados às coletas, como coordenadas geográficas, precipitação e temperatura, podem ser observados na tabela 1. As amostras foram coletadas de 0 a 20 cm profundidade, armazenadas em sacos plásticos e transportadas para o Laboratório de Microbiologia Ambiental na Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna- São Paulo (Aliquotas de cada amostra foram separadas para análise molecular e mantidas em freezer a -80 °C.)

Tabela 1 - Localização geográfica dos pontos de coleta do bioma Caatinga realizada em abril/2014 e o bioma Mata Atlântica em novembro/2014. Os dados de precipitação e temperatura máxima e mínima são referentes à média mensal

| Pontos de coleta | Coordenadas | | Precipitação (mm) | Temperatura mínima (°C) | Temperatura máxima (°C) |
|------------------|--------------|--------------|-------------------|-------------------------|-------------------------|
| | S | W | | | |
| Bertioga-SP | 23°43'24.0" | 46°01'51.3" | 7,8 | 19,8 | 26,3 |
| Cananéia-SP | 24°53'24.0" | 47°50'39.0" | 6 | 19,8 | 28,4 |
| CEC-PE | 09°23'36,67" | 40°24'44,89" | 1,7 | 19,5 | 31,3 |
| Mandacaru-BA | 09°03'35,62" | 40°18'41,88" | 1,6 | 19,6 | 31,4 |

Fonte: Climate-data.org

2.3.2 Montagem do experimento para avaliação dos ciclos de umidade

Para estudo comparativo de três ciclos de umidade (C1.60; C1.30; C2.60; C2.30; C3.60; C3.30), o experimento foi preparado em frascos de vidro de aproximadamente 200 mL, autoclavados. Foram adicionados 50 g de solo coletados

em diferentes regiões (MAB: Bertioga; MAC: Cananéia; CEC: Petrolina; CAM: Mandacaru) (Figura 2). Os solos foram corrigidos para umidade de 60 % pela adição de água destilada autoclavada, e incubados em estufa de cultura, modelo 002 CB (Fanem LTDA®) a 28°C. Após 14 dias, amostras do solo foram retiradas dos frascos do ciclo um, com 60 % de umidade e armazenadas em freezer para posterior extração do DNA total e alíquotas foram guardadas em geladeira para análise da atividade enzimática. Os frascos foram mantidos em estufa até atingir 30 % de umidade, permanecendo assim por 14 dias, sendo realizadas as mesmas análises acima. O mesmo procedimento foi mantido para os dois próximos ciclos.

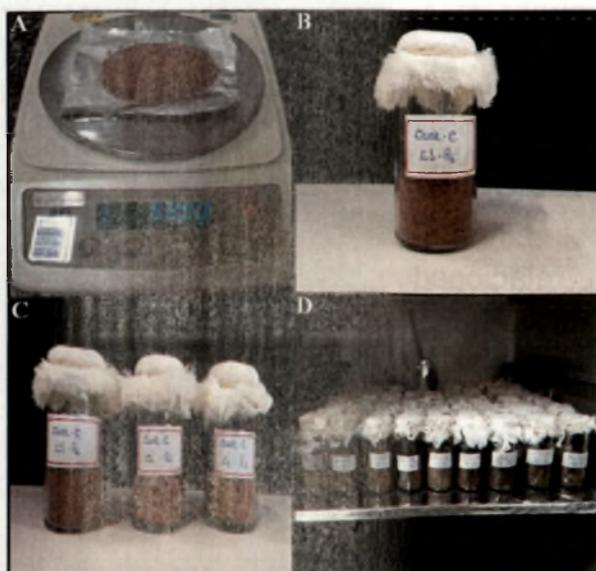


Figura 2 - Esquema da montagem do experimento onde: (A) pesagem das amostras; (B) frasco de vidro contendo 50 g de solo; (C) repetições por ciclo/umidade; (D) experimento montado na estufa de cultura

2.3.3 Análise físicas e químicas das amostras de solo

A análise química dos solos (fósforo (P), enxofre (S), cálcio (Ca), Magnésio (Mg), potássio (K), acidez potencial (H+Al), soma de bases (SB), índice de saturação de bases (V), matéria orgânica (M.O) e pH) foram encaminhadas para o laboratório de análise de solo do Departamento de Ciência do Solo (LSO) da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"- ESALQ/USP. O carbono e nitrogênio totais, foram analisados por analisador elementar LECO TruSpec CN após as amostras secadas e peneiradas (em malha 100 mesh) (Tabela 3).

A umidade do solo foi realizada de acordo com o protocolo ISO 11268-2, sendo calculada a diferença de 10 g de solo fresco e o seco após ficar exposto a 105° por 24 horas. O cálculo foi determinado da seguinte forma:

$$\text{CRA} = \frac{\text{PSU} - \text{PSS}}{\text{PSS}} \times 100$$

Onde: CRA- Capacidade de retenção de água; PSU- peso do solo úmido; PSS- peso do solo seco.

Tabela 2 - Atributos obtidos a partir de análises físico-química do solo para as quatro áreas de coleta na Caatinga e Mata Atlântica

| Variáveis | MA-B | MA-C | CEC | CAM |
|--------------------------------|--------|-------|-------|-------|
| Química | | | | |
| pH | 4,3 bc | 4,2 c | 4,5 b | 6,1 a |
| M.O (g.dm ⁻³) | 22 c | 55 a | 15 d | 34 b |
| P (mg.dm ⁻³) | 14 | 5 | 5 | 13 |
| S (mg.dm ⁻³) | 8 | 5 | < 4 | 4 |
| K (mmolc.dm ⁻³) | 2,3 | 1,1 | 1,7 | 2,2 |
| Ca (mmolc.dm ⁻³) | 2 | 10 | 6 | 216 |
| Mg (mmolc.dm ⁻³) | 2 | 7 | < 1 | 43 |
| H+Al (mmolc.dm ⁻³) | 47 | 88 | 16 | 13 |
| SB (mmolc.dm ⁻³) | 6,3 | 18,1 | 8,7 | 261,2 |
| CTC (mmolc.dm ⁻³) | 53,3 | 106,1 | 24,7 | 274,2 |
| V (%) | 12 | 17 | 35 | 95 |
| Física | | | | |
| Umidade (%) | 39,01 | 43,7 | 27,04 | 41,92 |

H+Al-acidez potencial; MO-matéria orgânica; CTC-capacidade de troca de cátions; SB-soma de bases; V- saturação por bases.

Tabela 3 - Carbono e nitrogênio total e relação C/N das quatro áreas de coleta nos três ciclos de umidade. Valores médios (n=3) e desvio padrão são apresentados

| | C total (%) | N total (%) | Relação C/N |
|------------|-------------|-------------|-------------|
| MA-B C1 60 | 2,28± 0,08 | 0,17± 0,00 | 12,7± 0,56 |
| MA-B C1 30 | 2,22± 0,05 | 0,16± 0,00 | 13,2± 0,51 |
| MA-B C2 60 | 2,14± 0,19 | 0,15± 0,01 | 14,6± 0,90 |
| MA-B C2 30 | 2,33 ± 0,02 | 0,19± 0,02 | 11,9± 1,28 |
| MA-B C3 60 | 2,53± 0,07 | 0,21± 0,01 | 11,8± 0,39 |
| MA-B C3 30 | 2,24± 0,02 | 0,17± 0,00 | 13,3± 0,58 |
| MA-C C1 60 | 3,25± 0,31 | 0,25± 0,00 | 13,1± 1,36 |
| MA-C C1 30 | 3,28± 0,21 | 0,22± 0,00 | 14,2± 0,92 |
| MA-C C2 60 | 3,07± 0,06 | 0,25± 0,03 | 12,3± 1,51 |
| MA-C C2 30 | 3,15± 0,08 | 0,27± 0,00 | 11,4± 0,45 |
| MA-C C3 60 | 3,20± 0,27 | 0,26± 0,01 | 12,0± 0,50 |
| MA-C C3 30 | 3,61± 0,07 | 0,24± 0,02 | 14,8± 1,47 |
| CEC C1 60 | 0,58± 0,03 | 0,07± 0,00 | 7,7± 0,27 |
| CEC C1 30 | 0,56± 0,03 | 0,06± 0,00 | 8,8± 0,34 |
| CEC C2 60 | 0,57± 0,00 | 0,07± 0,00 | 8,0± 0,69 |
| CEC C2 30 | 0,57± 0,01 | 0,06± 0,01 | 9,0± 1,64 |
| CEC C3 60 | 0,57± 0,03 | 0,07± 0,01 | 8,3± 1,29 |
| CEC C3 30 | 0,52± 0,01 | 0,08± 0,00 | 6,5± 0,50 |
| CAM C1 60 | 1,38± 0,06 | 0,13± 0,00 | 10,3± 0,13 |
| CAM C1 30 | 1,31± 0,02 | 0,12± 0,00 | 10,5± 0,61 |
| CAM C2 60 | 1,25± 0,08 | 0,13± 0,00 | 8,9± 0,92 |
| CAM C2 30 | 1,26± 0,02 | 0,14± 0,00 | 8,5± 0,04 |
| CAM C3 60 | 1,31± 0,01 | 0,13± 0,00 | 9,5± 0,21 |
| CAM C3 30 | 1,25± 0,07 | 0,13± 0,00 | 9,3± 0,52 |

2.3.4 Extração de DNA metagenômico do solo

Para extração do DNA total do solo, utilizou-se o kit comercial *Power Soil™ DNA Extraction Kit* (MoBio, Laboratories, EUA), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante a partir de 0,25 g de solo. Para verificar a integridade e quantidade do DNA extraído, uma alíquota de 5 µL de DNA e 5 µL de GelRed (*Biotium*) + LB (*loading buffer*) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1 % (p/v), sendo visível as bandas quando expostas a luz ultravioleta. O DNA restante foi armazenado no freezer (-80 °C) para as etapas posteriores.

2.3.5 Construção da biblioteca de amplicons do gene 16S rRNA de *Bacteria*

Para realizar o sequenciamento em larga escala do gene 16S rRNA das amostras, utilizou-se o *forward primer* A-967F (SOGIN, 2006) e sequências de barcodes a extremidade 5' dos iniciadores (Tabela 4). O *reverse primer* (WANG, 2009) foi o mesmo utilizado em todas as bibliotecas. As reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foram amplificadas segundo protocolo de Sogin (2006) para um volume de 25 µL, água ultrapura (Milliq), 2,50 µL de *Buffer* 10 x, 2,50 mM de MgCl₂, 0,50 mM de dNTP's, 0,25 pmol/µl de *reverse primer* e 0,50 u/µL da Taq

DNA polimerase, para o Mix, após serão adicionados 0,25 pmol/μL de barcode e 0,50 μL do DNA das amostras. A reação foi realizada em termociclador 96 *Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems), programado para o ciclo de 94 °C por 5 minutos (desnaturação), seguido de 30 ciclos de 94 °C/ 30 segundos (desnaturação); 55 °C/ 30 segundos (anelamento); 72 °C/ 1 minuto e 30 segundos (extensão), por fim a extensão final a 72 °C/ 5 minutos. Após a amplificação, a reação foi submetida a gel de agarose 1 %. Após a quantificação as amostras foram purificadas no E-Gel[®] SizeSelect[™] 2% Agarose Gel (*Life Technologies*), utilizando como referencia o marcador 100 bp (pares de bases) DNA Ladder (100 a 1000 pb). Inicialmente foi feito um mix de 5 μL de cada amostra de DNA (Mata Atlântica, mix L1 e Caatinga, mix L2), e destas, 20 μL foram depositadas nos poços do *E-Gel* e ao final os mesmos 20 μL (amostra e água) foram coletados no tamanho entre 200/300 pb. Em seguida, a purificação em barra magnética foi realizada adicionando 150 μL de Agencourt[®] AMPure[®] XP Reagent em cada amostra coletada, seguida da adição de etanol 70 % e 30 μL de Low TE, seguindo o protocolo Ion Xpress[™]Plus gDNA *Fragment Library Preparation User Guide*.

Tabela 4 - Sequências dos *primers* e barcodes utilizados para amplificar a região 16S rRNA do domínio *Bacteria*

| <i>Primer</i> | Sequência | Sentido |
|-----------------------|--|----------------|
| A-967F | CAACGCGAAGAA CCTTACC | <i>forward</i> |
| <i>Reverse primer</i> | CCTCTCTA TGGG CAGT CCGT GATCGT CRTCCCCRCCTTCC | <i>reverse</i> |
| Barcode | | |
| 1 a 72 | GATCT; ATCAG; ACACT; AGCTA; CACAC; ACAGA; AGATG; CACTG; CAGAG; CGCAG; CTGTG; GTGAG; TCA TG; AGCAT; CAGCT; CATGT; CTGAT; CTGCA; GATGA; TACGC; ACTGC; GTCAC; CGTAC; TCGGT; CGACG; CTA CT; TGACT; GACAG; ATGCT; TCGTC; TATA C; ACGAC; TGTA G; TCGAG; TAGTG; CGAGT; ATACG; ACTCG; TCTGT; TCGCT; TACAT; GACGT; CTCGT; CGTCT; TACTA; ACTAT; AGTGT; ATAGT; ACGCA; ACGCA; ATATA; ATCGA; CAGTA; CGCGA; CTCTA; GTAGA; GTGTA; TAGCA; TCACA; TGATA; TGTCA; ACATC; AGAGC; ATGTC; CGCTC; CTAGC; GACTC; GAGAC; GCTAC; GTATC; TGCAC; TGTGC | <i>forward</i> |

2.3.6 Quantificação e purificação do produto de PCR

Para os procedimentos seguintes foram utilizados as amostras de DNA obtida a partir da técnica de PCR (item 5.5). A quantificação foi realizada no aparelho Qubit[®] 2.0 Fluorometer (Invitrogen, *Life Technologies*), para obter a quantidade de 1 μL de DNA na concentração μg/μL. Os amplicons foram misturados de maneira equimolar.

2.3.7 Avaliação da comunidade microbiana por meio do sequenciamento

O sequenciamento em larga escala foi realizado para estudar as comunidades bacterianas do solo através do gene que codifica o rRNA 16S ribossomal do domínio *Bacteria*. Para isso foi feita a reação de PCR, quantificação e purificação das amostras (itens 5.5; 5.6). O sequenciamento foi realizado através do equipamento Ion torrent (*Life Technologies*), onde as amostras foram submetidas ao Ion OneTouch 2, seguindo o protocolo Ion PGM™ Template OT2 400 Kit disponibilizado pela *Life Technologies*. Após estas etapas, foi realizado o sequenciamento dos fragmentos das bibliotecas de amplicons nos *chips* Ion 316™ por meio do kit Ion PGM™ 400 sequencing kit em equipamento PGM Ion Torrent para o sequenciamento.

2.3.8 Análise das sequências obtidas

As sequências obtidas do sequenciador PGM Ion Torrent foram posteriormente ¹ limpas utilizando o software QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*), seguindo o protocolo 454 Overview Tutoriais, onde as amostras serão agrupadas em OTUs (*Operational Taxonomic Unit*), em nível de similaridade de 97 % a partir dos "barcodes". Através de comandos específicos foram retiradas os *primers*, sequências de cloroplastos, mitocôndria e *singletons*. As *chimeras* foram identificadas por meio do software Mothur e retiradas em seguida pelo comando *filter_fasta.py* por meio do QIIME, resultando em sequências de 200 a 230 pb. Para cada OTU gerada, foram separadas sequências representativas de cada e feita as análises taxonômicas baseada nessas sequências, utilizando o método *Uclust* e o banco de dados do *Greengenes*. Foi gerado uma tabela de OTUs a partir do comando *make_otu_table.py* e a árvore filogenética a partir do comando *rep_set.tre*.

Os gráficos de barras para classificação taxonômica foram gerados a partir do comando *summarize_taxa_through_plots.py*, sendo os dados utilizados em nível de filo e classe no presente trabalho. As análises de α e β diversidade e comparações entre as bibliotecas serão realizadas pelos softwares Mothur (SCHLOSS et al., 2009) e Qiime (CAPORASO et al., 2010). As análises de abundância relativa foram realizadas com os grupos taxonômicos acima de 1 %. Foram calculados os índices de alfa diversidade (PD e Shannon) e análises de beta diversidade (índices de similaridade Bray-Curts e distância UniFrac).

2.3.9 Atividade enzimática

2.3.9.1 Atividade da fosfatase ácida e alcalina

A atividade da fosfatase ácida foi avaliada pela metodologia proposta por Eivazi e Tabatabai (1969). O substrato para determinação da atividade da enzima fosfatase é o p-nitrofenil fosfato (PNP 0,05M). Pesou-se 1 g de solo em frascos de vidro de 50 mL e foram adicionado 4 mL de MUB pH 6.5 (para fosfatase ácida); pH 11 (fosfatase alcalina) e 1 mL da solução PNP em seguida, incubando em banho-maria a 37 °C por 1 hora. Após 1 hora, para interromper a atividade da enzima, adicionou-se 1 mL de cloreto de cálcio (CaCl_2) (0.5M) e 4 mL de hidróxido de sódio (NaOH) (0.5M). Em seguida, filtrou-se a suspensão de solo em papel filtro Whatman nº 2. Para o controle foi realizado os passos anteriores, porém a adição do PNP foi após a incubação. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 420 nm (nanômetro) e a quantidade de p-nitrofenol foi determinada através da curva padrão de 0, 10, 20, 30, 40 e 50 µg de p-nitrofenol. A curva foi obtida diluindo 1 mL da solução padrão de p-nitrofenol em 100 mL de água destilada. Em seguida, foram pipetadas alíquotas de 0, 1, 2, 3, 4 e 5 mL e ajustado para 5 mL com água. A atividade da enzima é produzida por hora por grama de solo ($\mu\text{g p-nitrofenol g}^{-1}$ de solo seco h^{-1}).

2.3.9.2 Atividade da arilsulfatase

A atividade da arilsulfatase foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Tabatabai e Bremner (1970). O substrato para atividade da enzima arilsulfatase é o p-nitrofenil sulfato (PNS). Utilizou-se 1 g de solo adicionado a frascos de vidro de 50 mL junto a 4 mL de tampão acetato e 1 mL da solução PNS, incubando a 37 °C por 1 hora. A leitura em espectrofotômetro a 410 nm.

2.3.9.3 Atividade da desidrogenase

A atividade da desidrogenase foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Casida et al. (1964). O substrato para atividade da enzima desidrogenase é o cloreto de 2,3,5- trifeniltetrazol (TTC). Pesou-se 5 g de solo, adicionando 5 mL da solução de TCC. Para o controle não adicionou a solução de TCC. Incubou-se os frascos a 37 °C por 24 horas e após esse período foi adicionado 10 mL de metanol. A solução de solo foi centrifugada por 10 minutos a 3400 rpm (rotação por minuto) e em seguida, a leitura foi feita a 485 nm. As concentrações de TPF (trifenil formazan) foram calculadas com auxílio de uma curva padrão com 0, 5,

10, 20, 30 e 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de TPF. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g TPF g}^{-1}$ de solo seco 24h^{-1} .

2.3.9.4 Atividade da celulase e amilase

A atividade da celulase e amilase foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Schinner; Mersi, 1990. O substrato para a atividade da enzima celulase é o CMC (Carboximetil celulose sódico) e para a enzima amilase é o amido. Foram feitas pesagens de 5 g de solo, adicionando 15 mL dos substratos acima de acordo com a enzima. Para a celulase, os frascos foram incubados a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ e para amilase $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Após esse período as amostras foram centrifugadas e retirada 1 mL do sobrenadante, diluindo-o em 20 mL de água destilada. Em seguida 1 mL deste, foi transferido para tubo de ensaio e adicionado 1 mL do reagente A, 1 mL do reagente B e mantido em banho fervente por 15 minutos. Após esfriar, 5 mL do reagente C foi adicionado e a amostra ficou em repouso por 60 minutos até fazer a leitura a 690 nm. Para o controle a adição do CMC e do amido foi feita após a incubação em banho-maria por 24 horas. A curva padrão foi calculada a partir de 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 e 1.0 mL de glicose monohidratada. Os cálculos das atividades enzimáticas se deram a partir da equação:

$(C \cdot v \cdot f) / (sw \cdot dwt)$, onde:

C= concentração de glicose;

v= volume da suspensão teste (30 mL);

f= fator de diluição (20 mL);

sw= peso do solo úmido (5 g);

dwt= peso de 1 g de solo úmido.

Os resultados foram expressos em $\mu\text{g g}^{-1} \text{dwt } 24\text{h}^{-1}$.

2.3.9.5 Atividade da urease

A atividade da urease foi determinada através do método descrito por Tabatai e Bremner (1972). Foram pesados 5 g de solo em frascos de 100 mL e adicionaram-se 9 mL de tampão TRIS 50 mM e 1 mL de solução com uréia (200 mM), sendo incubados por 2 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após esse período foram adicionados 35 mL de cloreto de potássio com sulfato de prata ($\text{KCl} - \text{Ag}_2\text{SO}_4$) para que a reação fosse

interrompida deixando os frascos por 5 minutos a temperatura ambiente, completando posteriormente para 40 mL de KCl -Ag₂SO₄. Para estimativa da amônia liberada, foram pipetados 20 mL da suspensão de solo em um frasco de destilação contendo 0,2 g MgO, determinando o N-NH₄⁺ liberado pelo vapor da destilação através da titulação com H₂SO₄ (0.005 mol L⁻¹). Para cada triplicata das amostras foi feita uma amostra controle, sendo que a uréia foi adicionada após a solução de KCl -Ag₂SO₄. A determinação da atividade da urease foi dada através da equação: $((V_t - V_b) * 50 * 70 * F_c) * (PSS * 20)^{-1}$, onde:

V_t= volume da titulação do destilado

V_b= volume da titulação do branco

F_c= fator de correlação obtido pela titulação da solução de H₂SO₄

50= volume total da suspensão

20= volume da suspensão utilizado para destilação

70= 1 mL de H₂SO₄ é equivalente à 70 µg NH₄-N

PSS= peso de solo seco (PS-PU)

Os resultados foram expressos em ug N-NH₄ g⁻¹ de solo seco h⁻¹

2.3.9.6 Atividade da fitase

A atividade da fitase foi determinada através do método descrito por Ames (1966) e Chen et al. (2006). Pesou-se 0,1 g de solo em frascos de 50 mL e foram adicionados 5 mL solução de acetato de sódio (0.2M) contendo fitato de sódio (1M). As amostras foram incubadas por 1h a 37 °C. Após esse período, 0,5 mL de ácido tricloroacético (10 %) foram adicionados para parar a reação e centrifugadas por 5 minutos a 10000 rpm. Transferiu-se 100 µL do sobrenadante e acrescentou 1 mL de água destilada e 0,4 do reagente de molibdato. As amostras ficaram em repouso em temperatura ambiente por 10 minutos, para a leitura em espectrofotômetro a 420 nm. Para o controle foi adicionado fitato de sódio após a adição de ácido tricloroacético. A curva padrão foi calculada a partir de 0, 0.4, 0.5, 0.6, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0 e 2.0 mg/mL de fosfato de potássio. Os resultados foram expressos em ug fitato g⁻¹ de solo seco h⁻¹.

2.3.9.7 Análises estatísticas

Para avaliar as diferenças entre os parâmetros microbiológicos dos sítios e tratamentos foram realizadas Análise de Variância (ANOVA), e os testes de medida

LSD ($p \leq 0.05$) e Tukey ($p \leq 0.05$) e o teste de correlação de Pearson para verificar a relação entre as OTUs e as atividades enzimáticas. Utilizou-se para as análises estatísticas o aplicativo estatístico SAS 9.2 (SAS INSTITUTE, 1999).

2.4 Resultados e Discussão

2.4.1 Análise da riqueza e diversidade das comunidades bacterianas

A partir dos dados das comunidades bacterianas gerados pelo sequenciamento do gene 16S rRNA, estimou-se o valor máximo do número de sequências a partir da curva de rarefação. Assim, a riqueza da comunidade bacteriana foi verificada por meio de tal método ao nível de 97 % de similaridade. Também foram calculados os índices de alfa diversidade PD (*phylogenetic diversity*) e o índice de Shannon (H'). Os valores referentes aos índices para cada tratamento foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste LSD ($p \leq 0,05$).

Os dados se equipararam em número de espécies resultando uma curva de rarefação ascendente para todas as bibliotecas, não atingindo o platô (Figura 3). Assim, os resultados indicam que o sequenciamento do gene 16S rRNA das amostras de solo, não amostrou completamente a riqueza de espécies, mas sim de forma semelhante e portanto foram comparadas. Tais curvas indicam, ainda, que é provável que a riqueza do bioma Caatinga seja maior que o de Mata Atlântica, por meio do total de sequências obtidas.

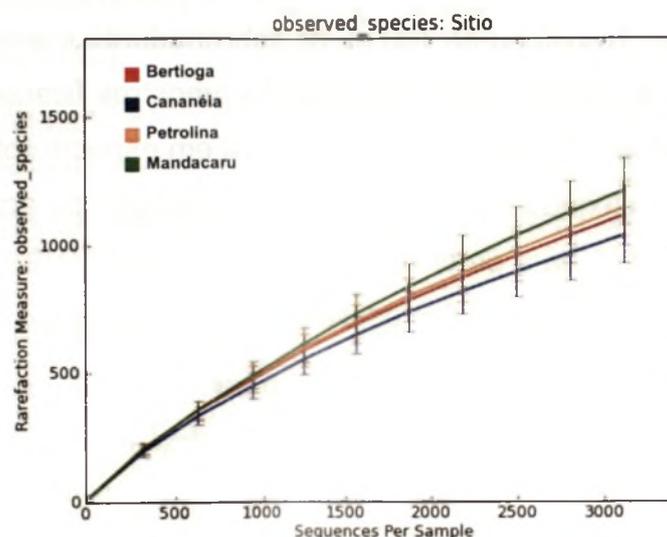


Figura 3 - Curva de rarefação gerada do gene 16S rRNA das bibliotecas dos sítios Bertloga, Cananéia, Petrolina e Mandacaru

O índice para calcular a alfa diversidade PD é uma medida quantitativa da diversidade filogenética, baseado nos ramos da árvore filogenética (FAITH, 1992). Já o índice de Shannon considera a abundância relativa dos grupos dominantes para cada tratamento. Os cálculos resultam que quanto maior for o valor dos índices, maior é a diversidade da comunidade amostrada.

Os valores obtidos nos dois índices revelaram uma queda da diversidade bacteriana ao longo dos três ciclos de secagem-umedecimento (Figura 4). A partir do primeiro ciclo (C1.30), observou-se queda na diversidade bacteriana nos solos da Mata Atlântica, e no ciclo 2 (C2 60) uma diminuição na diversidade nos solos da Caatinga. Apenas a diversidade da comunidade de Bertioga mostrou um aumento no terceiro ciclo. Esses resultados indicam que a comunidade bacteriana dos sítios amostrados é sensível às mudanças de umidade ao longo do período de exposição.

A diversidade em um sistema biológico se baseia na riqueza e abundância dos organismos presentes em um ambiente. A riqueza representa o número de espécies diferentes, enquanto a abundância diz respeito a sua distribuição (MELO, 2008). Pacchioni et al. (2014), que observaram uma maior riqueza bacteriana no solo da Caatinga em relação ao solo da Mata Atlântica. Essa diferença na densidade populacional pode estar associada com características do solo, tais como o efeito da umidade e porosidade, proposto por Carson et al. (2010) ao estudarem a hipótese se o teor da água altera a comunidade bacteriana do solo. Concluíram que o potencial hídrico afeta a riqueza das comunidades, uma vez que a baixa concentração de água aumentou a riqueza bacteriana, em contrapartida, com aumento de água, observaram um decréscimo na riqueza de tal comunidade. Fierer et al (2003), mostraram que a resposta da comunidade bacteriana pode estar relacionada com as adaptações ao estresse hídrico ao longo do tempo. Esses autores estudaram o efeito de ciclos de secagem-umedecimento nas comunidades bacterianas de dois solos distintos, e observaram uma redução na riqueza com o aumento dos ciclos. Porém quando compararam a diversidade das comunidades, não foram verificadas mudanças significativas.

Barnard et al. (2013), mostraram que as comunidades microbianas apresentaram resiliência e são capazes de se adaptar as mudanças ambientais. Esses autores encontraram que em solos com ocorrência de mudanças sazonais, as comunidades bacterianas mudam significativamente quando expostas à seca, em

seguida, retorna a composição pré-seca. O mesmo foi observado quando exposta a alta umidade.

Frossad et al. (2015), analisaram as comunidades bacteriana de solos do Deserto do Namib, quando submetidas a eventos de umedecimento. Eles observaram queda na diversidade bacteriana em solos mais úmidos. Concluíram que as comunidades alteram com a intensidade de umidade, ou seja, com a quantidade de água, ao invés da frequência de molhagem durante o período do experimento.

Entretanto, Kavamura et al. (2013) estudaram a comunidade bacteriana da rizosfera de plantas típicas da Caatinga, em duas estações distintas (chuva e seca) e relataram uma maior riqueza bacteriana no período de chuva. Concluíram que como essa comunidade é resistente aos eventos de chuva/seca, existe uma certa seleção de micro-organismos com mecanismos de tolerância eficazes.

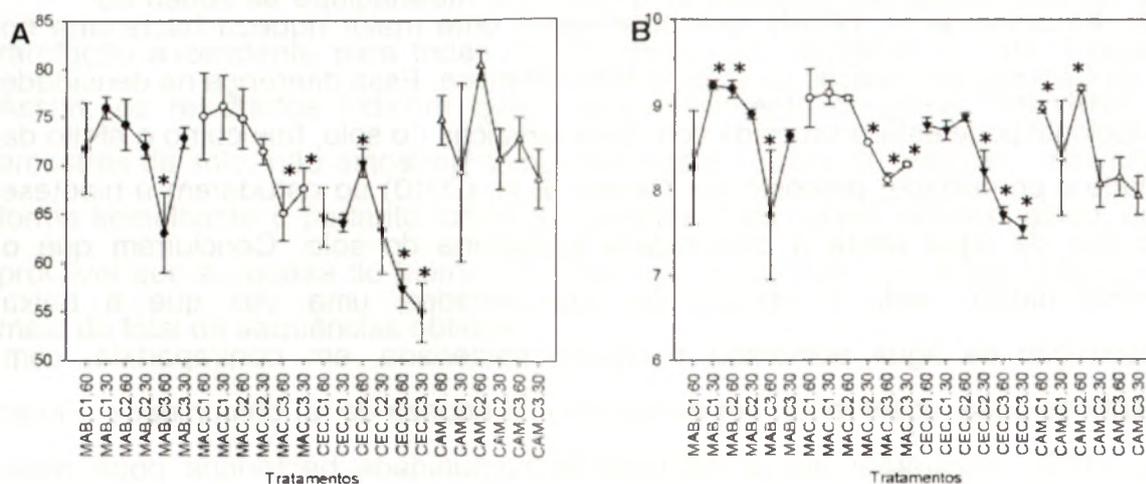


Figura 4 - Valores de diversidade, determinada pelo índice de PD (A) e Shannon (B) nos diferentes tratamentos dos sítios amostrados. O eixo X mostra os tratamentos, atribuídos aos sítios Bertioga (MAB), Cananéia (MAC), Petrolina (CEC) e Mandacaru (CAM), atribuídos aos três ciclos sazonais e umidade O eixo Y indica os valores dos índices de diversidade e o desvio padrão. *, $p \leq 0,05$

Os dados das comunidades bacterianas dos sítios amostrados comparados a partir da análise de coordenadas principais (PCoA), gerados pelo *software* QIIME, em que a beta-diversidade foi essencial para o agrupamento dos tratamentos (Figura 5). Com a análise obteve uma explicação de 40,0 % do total da variância amostrada dos sítios. Sendo que 20,0 %, 16,0 % e 4,0 % explicando na PC 1, 2 e 3, respectivamente. É importante notar essa porcentagem de variação indicada nos eixos, uma vez que o eixo vertical representa uma menor porcentagem do que o eixo

horizontal. Com o gráfico obtido é possível observar que houve diferença entre os pontos de coleta, onde as estrutura da comunidade bacteriana nos tratamentos de Mata Atlântica mostraram uma maior aproximação, em vista que os pontos amostrados na Caatinga foram observados uma maior dissimilaridade nas comunidades bacterianas.

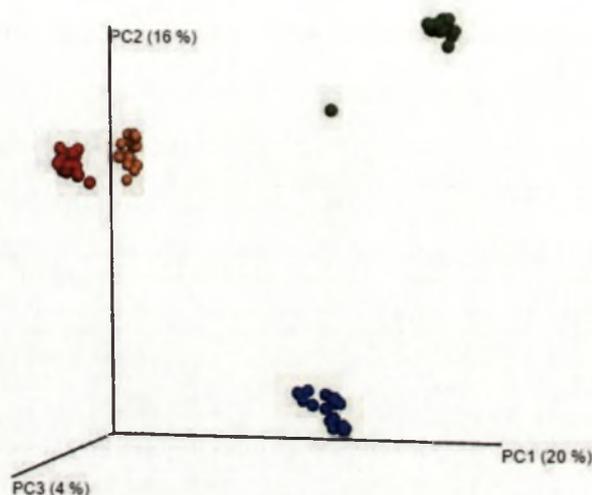


Figura 5 - Análise de Coordenadas Principais (PCoA) dos perfis das comunidades bacteriana dos tratamentos referentes ao quatro sítios amostrados. Bertioga (vermelho); Cananéia (Laranja); Petrolina (azul) e Mandacaru (verde)

No entanto, a análise mostrou que as comunidades bacterianas separam-se, com sobreposição, o que significa que a comunidade se distingue, mas compartilham de alguns grupos nos diferentes tratamentos.

O índice de similaridade para análise de beta-diversidade utilizado foi o Bray-Curtis e também, a distância UniFrac, os valores encontrados para cada tratamento foram submetidos à análise de variância (ANOVA) ($p \leq 0,05$), e as médias foram comparadas pelo teste LSD. Essas duas análises permitiram a comparação entre a estrutura das comunidades bacterianas associadas aos tratamentos (Figura 6). Os valores calculados para Bray-Curtis, vão de 0 a 1, em que quanto mais próximo de zero, mais similar é a estrutura da comunidade. Contudo, quanto mais próximo de um, a comunidade se mostra dissimilar. Ambas as análises feitas indicam que há uma diferença significativa entre as estruturas das comunidades bacterianas nos tratamentos de Cananéia, Petrolina e Mandacaru. Resultados semelhantes foram observados no índice de similaridade Bray-Curtis e pela distância UniFrac. Para Bertioga variou de 0,41 a 0,49 e 0,53 a 0,62 ($p \leq 0,05$); Cananéia de 0,35 a 0,48 e

0,54 a 0,57 ($p \leq 0,05$); Petrolina de 0,34 a 0,42 e 53 a 0,57 ($p \leq 0,05$) e Mandacaru de 0,38 a 0,77 e 0,54 a 0,66 ($p \leq 0,05$) para o índice Bray-Curtis e distância UniFrac, respectivamente.

O índice de Bray-Curtis não considera que um mesmo grupo esteja presente em todas as amostras, mas é influenciado pelos grupos dominantes presentes na mesma (PINTO-COELHO, 2007). Já a distância UniFrac é baseada nos ramos da árvore filogenética compartilhada entre duas ou mais comunidades, resultando em ramos mais próximos, comunidades mais similares (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005). Portanto, o solo de Bertioga apresentou comunidades mais similares em seus tratamentos, enquanto as amostras provenientes de Mandacaru apresentaram a maior distância de dissimilaridade, colaborando com o gráfico da PCoA.

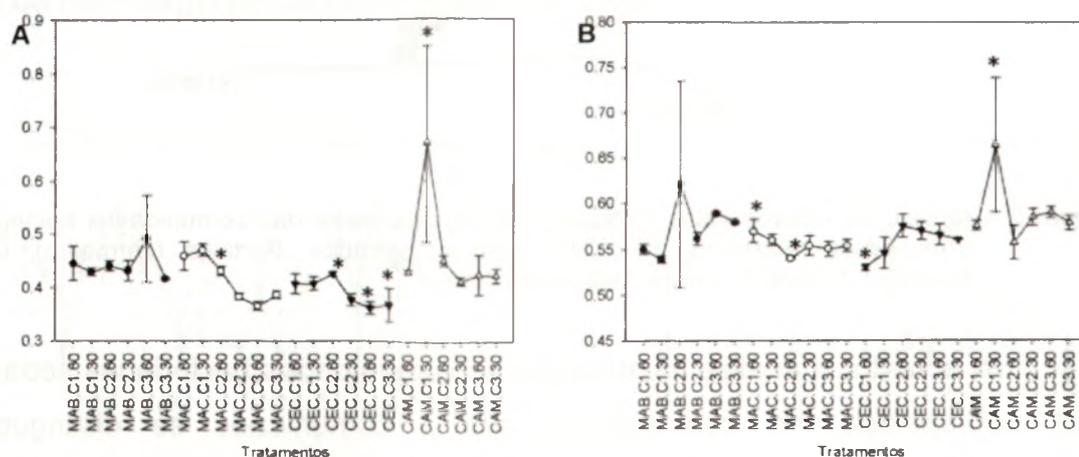


Figura 6 - Valores de beta-diversidade, determinada pelo índice Bray-Curtis (A) e distância UniFrac (B) nos diferentes tratamentos dos sítios amostrados. O eixo X mostra os tratamentos, atribuídos aos sítios Bertioga (MAB), Cananéia (MAC), Petrolina (CEC) e Mandacarus (CAM) atribuídos aos três ciclos sazonais e umidade. O eixo Y indica os valores dos índices de diversidade e o desvio padrão. *, $p \leq 0,05$

2.4.2 Análise da comunidade bacteriana a partir do sequenciamento do gene 16S rRNA

Com o intuito de conhecer sobre os grupos taxonômicos envolvidos nos ciclos de secagem-umedecimento e relacioná-los com as atividades enzimáticas foi feito o sequenciamento por Ion Torrent. Foram acessadas 56.160 sequências, tamanho de 200-230 pb (pares de base) da região V6 do gene 16S rRNA. Essas sequências foram agrupadas em OTUs, com similaridade de pelo menos 97 %. Deste total, 14,4 % foram não classificadas.

As OTUs pertencentes ao Domínio *Bacteria*, enquadraram-se em 23 filos, sendo que destes, sete apresentaram abundância relativa maior que 1% para a maioria dos tratamentos. Os solos coletados na Mata Atlântica resultaram em 19.098 OTUs para o sitio Bertioga e 17.805 para Cananéia. Para os sítios provenientes da Caatinga, os solos de Petrolina apresentaram 24.701 OTUs e Mandacaru, 18.996.

Os filos Proteobacteria, Acidobacteria e Verrucomicrobia, com 39,6 %, 34,2 % e 2,1 %, respectivamente foram mais abundantes nos solos de Mata Atlântica. Já Actinobacteria, Chloroflexi, Gemmatimonadetes e Firmicutes, com 35,8 %, 15,8 %, 3,6 % e 2,0 % foram os filos predominantes da comunidade encontrada nos sítios da Caatinga (Figura 7). Aqueles membros pertencentes aos filos raros (<1%) compreenderam 18,0 %, 14,2 %, 15,3 % e 21,7 % das sequências resultantes dos solos de Bertioga, Cananéia, Petrolina e Mandacaru, respectivamente.

Embora o objetivo principal do trabalho fosse determinar os efeitos dos ciclos de umidade sobre a comunidade bacteriana, também avaliamos a diferença na composição taxonômica da comunidade dos dois biomas a fim de entender como a comunidade por ser afetada pelo estresse hídrico.

Existem relatos similares na literatura quanto à composição das comunidades bacterianas em solos da Caatinga e da Mata Atlântica. Recentemente, Pacchioni et al. (2014) observou os filos Proteobacteria e Acidobacteria com maior frequência nos solos da Mata Atlântica, e Actinobacteria e Bacteriodetes no da Caatinga. Faoro et al. (2010) ao estudar a diversidade de bactérias em solos da Mata Atlântica, encontrou como os grupos mais abundantes Acidobacteria, seguido de Proteobacteria, Gemmatimonadetes e Firmicutes. No mesmo ano, Bruce et al. (2010), analisando a comunidade bacteriana revelaram que os filos mais presentes no solo da Mata Atlântica foram Acidobacteria, Proteobacteria e Verrucomicrobia.

Os resultados encontrados referentes à Caatinga são reafirmados com estudos desenvolvidos anteriormente. Taketani et al. (2014) relataram a abundância dos filos Actinobacteria e Protobacteria, em amostras de solo da rizosfera. Assim como Ferreira (2014) ao analisar o solo de três plantas de Petrolina, encontrou a maior porcentagem de Actinobacteria, seguido de Proteobacteria e Firmicutes.

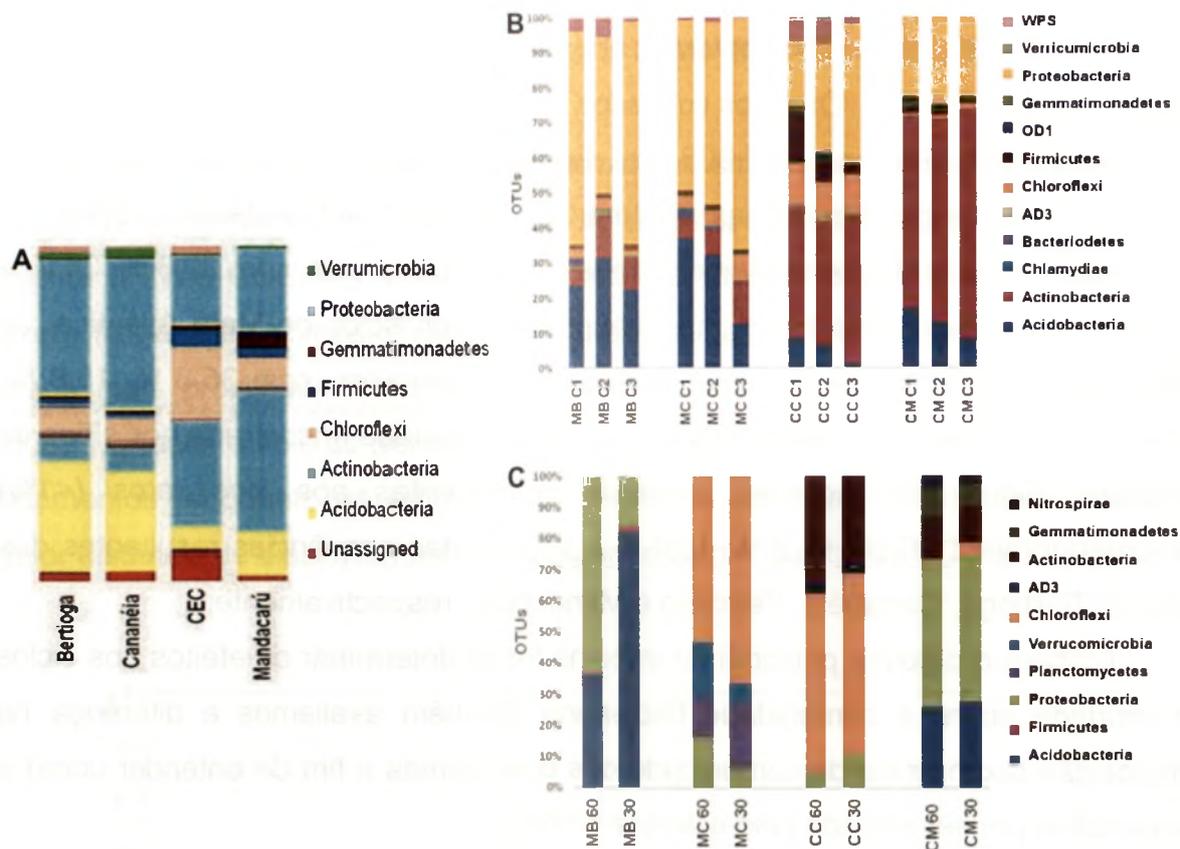


Figura 7 - Filos com abundância relativa acima de 1 % (maioria das amostras) para as médias obtidas nos tratamentos Bertioga (MAB), Cananéia (MAC), Petrolina (CEC) e Mandacaru (CAM). (A) filos a partir dos sítios amostrados; (B) filos abundantes ao efeito dos ciclos sazonais; (C) filos referentes ao efeito de umidade

A fim de discriminar a presença ou ausência de OTUs quando dispostos ao efeito dos ciclos de umidade, a partir da análise de correlação de Pearson, aquelas que apresentaram valores estatisticamente significativos $p \leq 0,05$ foram relacionadas ao efeito do ciclo de umidade e da umidade (Figura 7).

Quando analisados os efeitos da umidade sobre os grupos taxonômicos nos solos de Bertioga, o filo Acidobacteria apresentou um aumento na abundância relativa quando expostos a umidade relativa de 30 %, em contrapartida, o filo Proteobacteria apresentou uma diminuição na abundância relativa quando exposto a mesma umidade. Já em Cananéia observou-se maior porcentagem do filo Chloroflexi e Planctomycetes a 30 % de umidade. Assim como este também predominou nos solos de Petrolina, junto ao filo Actinobacteria que apresentou uma queda quando exposto a umidade do solo. Em Mandacaru foi inferido os filos Proteobacteria e Acidobacteria (Figura 7).

O teor de umidade do solo pode resultar em consequências nas atividades da comunidade microbiana. Quando há ocorrência de chuvas, o alto teor de umidade tende a diminuir as taxas de decomposição da matéria orgânica, em resposta do baixo suprimento de oxigênio. Por sua vez, quando há um baixo teor de umidade, a atividade microbiana tende a diminuir por conta da redução de substratos solúveis e mobilidade microbiana. Essas mudanças no teor de umidade podem acarretar uma modificação da comunidade microbiana do solo, sugerindo que a umidade do solo pode influenciar os padrões de diversidade (ZHOU et al., 2002).

Os estudos voltados para o conhecimento da microbiota da Mata Atlântica mostram a presença do filo Acidobacteria, com dominância em todos os trabalhos citados. Acredita-se que esse grupo tenha um papel importante para a ciclagem de nutrientes no solo (LEE et al., 2008). O mesmo tem se encontrado com maior abundância em solos com pH ácido (SAIT et al., 2006). Integrantes desse filo têm o potencial de resistência à dessecação e ainda estão envolvidos na produção de biofilme (WARD et al., 2009). O solo da Mata Atlântica é sempre úmido, e geralmente apresenta pH ácido (SILVA et al., 2007), corroborando com os das amostras de Bertioga (pH 4.3; M.O. 22 g.dm⁻³) e Cananéia (pH 4.2; M.O. 55 g.dm⁻³), o que sugere a presença desse grupo, associado ao pH, a umidade e a presença de matéria orgânica, favorecendo os grupos de micro-organismos decompositores.

Da mesma forma, considerando a presença do grupo Actinobacteria nos solos onde a disponibilidade de água é menor, esse filo apresenta-se sendo frequentemente isolado em ambientes áridos e semiáridos (NIE et al., 2012), além de relatos de resistência a radiação ultravioleta (UV) (GTARI et al., 2012) e sobreviver a temperatura próxima a 80 °C (JAOUANI et al., 2012). Os esporos do gênero *Streptomyces* são capazes de germinar em condições ambientais de baixa umidade (ZVYAGINTSEV et al., 2007).

O filo Proteobacteria é descrito como o mais abundante em diversos ambientes (SAIT; JANSSEN, 2006). Possuem grande diversidade morfológica, fisiológica e metabólica. Além da grande importância de representantes desse grupo nos ciclos do C, N e S. A maioria dos seus representantes é mesófila, mas existem termófilos e psicrófilos. Metabolicamente encontram-se os quimiorganotróficos, quimiolitotróficos e fototróficos (KERSTERS et al., 2006; WOESE, 1990; SPAIN et al., 2009). Dentre as classes desse filo estão Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria e Deltaproteobacteria.

A abundância dos filos Proteobacteria, Acidobacteria, Chloroflexi, Actinobacteria e Planctomycetes foram claramente alteradas pelo efeito da umidade o que levou a alteração na abundância relativa desses grupos. As mudanças na umidade relativa do solo são estressantes para os micro-organismos, que por sua vez, precisam aumentar seu metabolismo para responder a essas alterações (PEDRAZ, 2015). Os padrões de disponibilidade de água provavelmente podem selecionar os micro-organismos indígenas com estratégias fisiológicas que os tornam tolerantes a falta ou excesso da disponibilidade de água no solo (STARK; FIRESTONE, 1995; BARNARD, 2013).

Em condições de seca, quando há adição de água, os grupos microbianos presentes no solo sofrem o efeito da mudança sazonal (PLACELLA et al., 2012). Tais autores estudaram o comportamento da comunidade bacteriana em solos da Califórnia, EUA e observaram que alguns grupos retomaram suas atividades em um tempo mais curto, como o filo Actinobacteria e Firmicutes (entre 1 a 24 horas), e o filo Proteobacteria, por exemplo, responderam em um período de 24 a 72 horas após o aumento na disponibilidade de água. Segundo Alam et al. (2011) o filo Actinobacteria é capaz de sintetizar proteínas mais rápida quando comparado aos demais filos, podendo atribuir esse a um dos motivos de sua rápida resposta.

Barnard et al. (2015), relataram que em solos de ambientes secos, quando submetidos ao período de alta umidade a comunidade bacteriana presente se altera. Observaram que a abundância do filo Acidobacteria aumenta com a adição de água e do filo Actinobacteria diminui. Segundo os autores, isso se deve ao fato de alguns grupos bacterianos possuírem uma resposta metabólica mais rápida para se adaptar as mudanças ambientais.

De acordo com os dados observados nesse e em outros estudos, Actinobacteria, Acidobacteria e Proteobacteria são filos que sempre estão presentes quando se observam o impacto das alterações de umidade no solo, e que apresentam mecanismos capazes de se adaptar a períodos de seca e umidade. Entretanto, são necessários mais estudos para compreender tais mecanismos pelo qual esses filos estão presentes nos solos diante a essas mudanças no ambiente.

Analisando-se os quatorze filos (Figura 7) mais presentes nos quatro sítios estudados, cinco apresentaram classes com abundância relativa acima de 1 % (Figura 8). O filo Acidobacteria foi representado por cinco classes, em que nos solos da Mata Atlântica, encontram-se Acidobacteria (14,0 e 15, 2 %,) e Solibacteres (7,8

e 5,5 %) para Bertioiga e Cananéia, respectivamente. Para os sítios da Caatinga, às classes Solibacteres e Acidobacteria (3,9 e 2,4 %, para Petrolina), Acidobacteria-6, Chloracidobacteria e Solibacteres (6,6; 4,1; e 1,1 % para Mandacaru). O Filo Actinobacteria, quatro classes foram predominantes para todos os locais amostrados, com exceção da classe Rubrobacteria (1,1 e 18 %), presente apenas nos solos da Caatinga. As classes Actinobacteria (16,3; 15,9; 5,4 e 4,9 %), Thermoleophilia (0,6; 0,6; 12 e 4,9 %) e Acidimicrobiia (0,7; 0,5; 1,0 e 1,5 %) foram representadas para os quatro sítios amostrados, respectivamente. As classes Anaerolineae e Ktedonobacteria (filo Chloroflexi) foram as mais abundantes nas amostras de Mata Atlântica. O sítio de Mandacaru apresentou três classes com abundância acima de 1 %, TK10 (1,5 %); Chloroflexi (2,0 %) e Anaerolineae (3,0 %). Comparando-se o filo Proteobacteria, quatro classes foram predominantes nos solos dos dois biomas. Sendo as classes Alphaproteobacteria (11,7; 19,0; 5,9 e 7,1 %) e Betaproteobacteria (11,1; 10,1; 1,7 e 5,5 %) mais abundantes nos solos da Mata Atlântica. Além das classes Gammaproteobacteria (12,0; 10,7; 11,0 e 3,9 %) e Deltaproteobacteria (4,5; 3,7; 1,5 e 7,4 %).

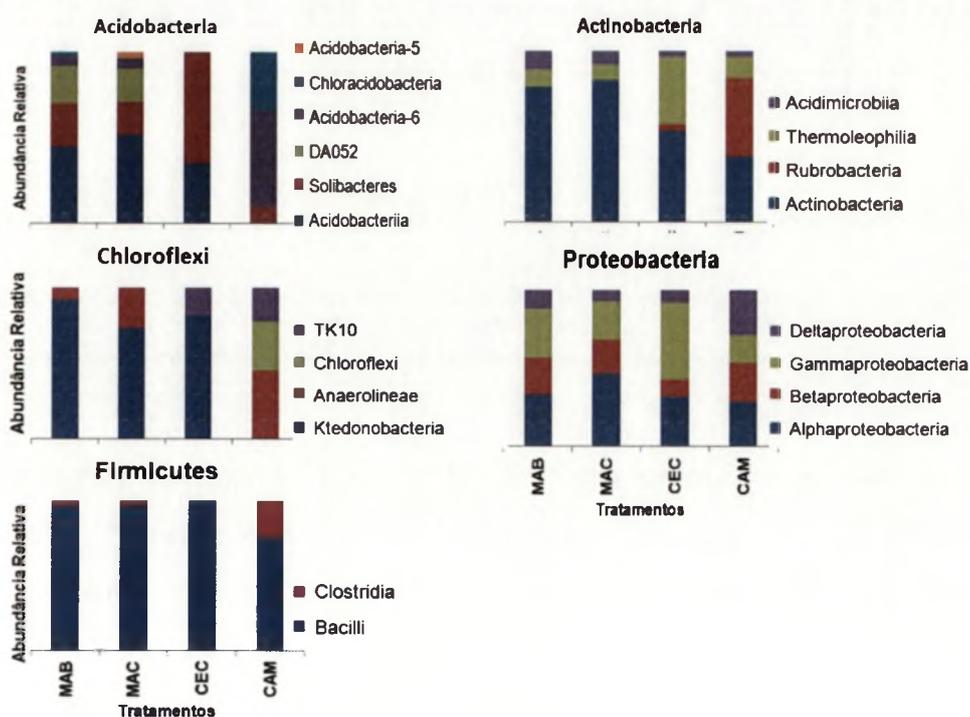


Figura 8 - Classes com abundância relativa acima de 1 % (maioria das amostras) para as médias obtidas nos tratamentos Bertioiga (MB), Cananéia (MC), Petrolina (CEC) e Mandacaru (CAM)

O efeito da umidade ao longo dos ciclos de umidade selecionou grupos taxonômicos semelhantes entre os solos da Mata Atlântica e entre os solos da Caatinga (Figura 9). As análises taxonômicas das OTUs, com efeito significativo dos ciclos de umidade relacionaram a estas classes como as principais presentes nos solos da Mata Atlântica, Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria e Betaproteobacteria, referentes ao filo Proteobacteria e a classe Acidobacteria, filo Acidobacteria. Para os solos da Caatinga, as classes mais predominantes foram Thermoleophila, Chloracidobacteria, filo Firmicutes e Acidobacteria, do filo Acidobacteria. Além das classes pertencentes ao filo Chloroflexi, são Ktedonobacteria e Anaerolineae. O filo Proteobacteria foi representado pelas classes Gammaproteobacteria e Betaproteobacteria

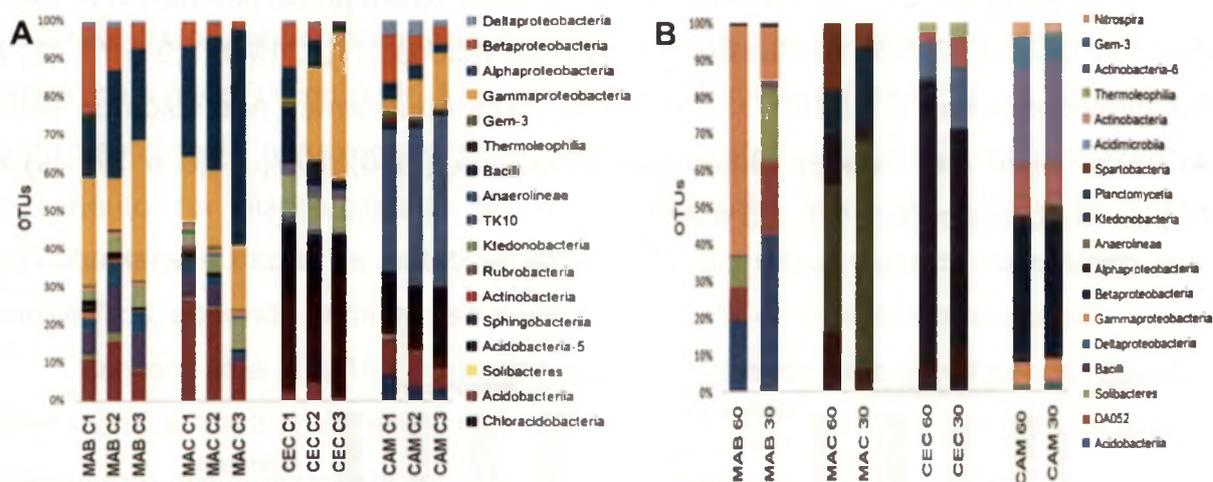


Figura 9 - Classes com abundância relativa acima de 1 % para as médias obtidas nos tratamentos Bertioga (MAB), Cananéia (MAC), Petrolina (CEC) e Mandacaru (CAM). (A) classes abundantes ao efeito dos ciclos sazonais; (B) classes referentes ao efeito de umidade

A análise metagenômica indicou a partir dos grupos taxonômicos que características do ambiente desempenharam um papel importante na determinação das comunidades microbianas. Portanto, as amostras de solo tendem a ser mais semelhantes quando analisadas de ambientes com características parecidas (TRINGE et al., 2005.; JEFFRIES et al., 2011). Nos solos da Mata Atlântica a cobertura vegetal e alta umidade podem ter selecionado a comunidade bacteriana,

assim como, as condições de estresse causadas por altas temperaturas, UV e seca podem ter selecionado a comunidade da Caatinga.

2.4.3 Atividade enzimática

A qualidade do solo é definida como capacidade do solo em regular o fluxo de água e solutos, degradar e imobilizar compostos orgânicos e inorgânicos e atuar na ciclagem de nutrientes, além de manter a diversidade biológica (SEYBOLD et al., 1998). Os micro-organismos são bioindicadores da qualidade do solo, à medida que sua atividade biológica é alterada por alguma resposta a mudanças que ocorrem no ambiente (ARAÚJO, 2007). A fim de entender o comportamento das atividades enzimáticas nos solos dos quatro sítios amostrados quando expostas aos ciclos de umidade, foram realizadas análises das atividades das seguintes enzimas: desidrogenase, fosfatase ácida e alcalina, arilsulfatase, celulase, amilase, fitase e urease.

Neste estudo, os atributos microbiológicos variaram de acordo com os sítios analisados e no decorrer dos tratamentos para efeito do estresse hídrico. Considerando as atividades da fosfatase ácida e alcalina, os valores diferiram significativamente entre os solos da Mata Atlântica e da Caatinga ($p \leq 0,05$). Em relação ao efeito dos ciclos de umidade, observou-se uma oscilação entre os três ciclos ($p \leq 0,05$) (Figura 10).

A atividade da fosfatase ácida apresentou uma correlação com a atividade das enzimas arilsulfatase e urease e com o C e N totais. Já a atividade da fosfatase alcalina apresentou correlação positiva com a desidrogenase, arilsulfatase, amilase, C e N totais e relação C/N (Tabela 5). As fosfatases são subdivididas em ácida e alcalina referente ao pH de atividade máxima dessas enzimas (TABATABAI, 1982). São enzimas produzidas por micro-organismos, como bactérias e fungos e estão diretamente relacionadas com a degradação de compostos orgânicos no solo. Assim, sofrem influência indireta do carbono e nitrogênio do solo, ao estimular a atividade dos micro-organismos (SALAZAR et al., 2011). Criquet et al. (2004) observaram uma correlação negativa entre a atividade da fosfatase ácida e a mudança na umidade relativa do solo e temperatura. Baldrian et al. (2008) relataram que a atividade das fosfatases ácida e alcalina são sensíveis a alterações sazonais, mostrando maior atividade no período de chuva.

A atividade das enzimas foi influenciada pelos ciclos de secagem-umedecimento, indicando que essas alterações influenciam na atividade microbiana do solo. A entrada de água no solo pode interferir na decomposição da matéria orgânica (BERG, 2000) e conseqüentemente, pode afetar a atividade das enzimas, que são indicadores da qualidade do solo, por apresentarem alta sensibilidade a alterações no ambiente. Segundo Moreira e Siqueira (2006) a água, em conjunto com a temperatura, influencia na atividade enzimática, contribuindo para a atividade microbiana. Araújo (2003) mostrou em seu estudo que o aumento da umidade e nutrientes no solo no período do verão favoreceu a atividade dos micro-organismos. Segundo Moura et al. (2015) a sensibilidade da microbiota a mudanças do microclima está relacionada com a umidade do solo, sendo esse fator a causa das variações observadas em seu trabalho na contagem de fungos e bactérias do solo.

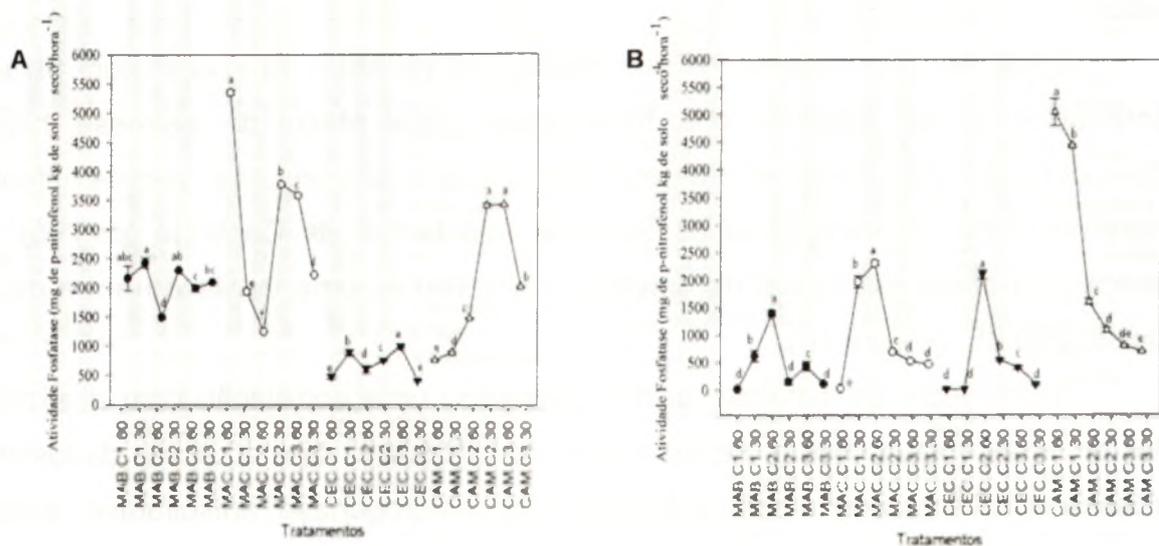


Figura 10 - Valores de atividade de fosfatase ácida (A) e fosfatase alcalina (B) nos diferentes tratamentos Bertioga (MAB), Cananéia (MAC), Petrolina (CEC) e Mandacaru (CAM), atribuídos aos três ciclos sazonais e umidade. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si (Tukey $p \leq 0,05$)

A atividade da arilsulfatase separou significativamente os dois biomas, Mata Atlântica e Caatinga ($p \leq 0,05$). O efeito dos ciclos de umidade foi observado principalmente nos solos da Mata Atlântica, onde o ciclo um diferiu dos demais ciclos (Figura 11). Essa enzima é produzida por micro-organismos e plantas, responsável pela mineralização do enxofre orgânico, e está presente praticamente nos solos de todas as regiões do mundo. A atividade da arilsulfatase é influenciada por fatores ambientais como pH, umidade e temperatura. A atividade máxima encontra-se entre

20 °C e 40 °C e pela umidade relativa de 60 % ou superior do solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Neste sentido, características fisiológicas dos grupos microbianos no solo da Mata Atlântica podem estar relacionadas com a maior atividade da arilsulfatase em relação aos grupos microbianos encontrados no solo da Caatinga. Alguns trabalhos mostram a sensibilidade sazonal da atividade da arilsulfatase em diferentes solos, em que no período chuvoso a atividade é maior em relação ao período de seca (NOGUEIRA; MELO, 2003; SILVA et al., 2012).

A arilsulfatase apresentou correlação positiva com a desidrogenase, fosfatases, fitase, urease, C e N totais e relação C/N (Tabela 5). Segundo Nogueira et al. (2003) a atividade da arilsulfatase tende a aumentar quanto maior o teor de matéria orgânica na superfície do solo, devido esta fornecer o substrato da enzima, que são os ésteres de sulfato. Segundo Vong et al. (2004) a concentração de C e N no solo correlaciona-se com a biomassa microbiana. Sendo assim, a atividade da arilsulfatase é estimulada pela microbiota do solo a partir de maiores concentrações de N e C do solo.

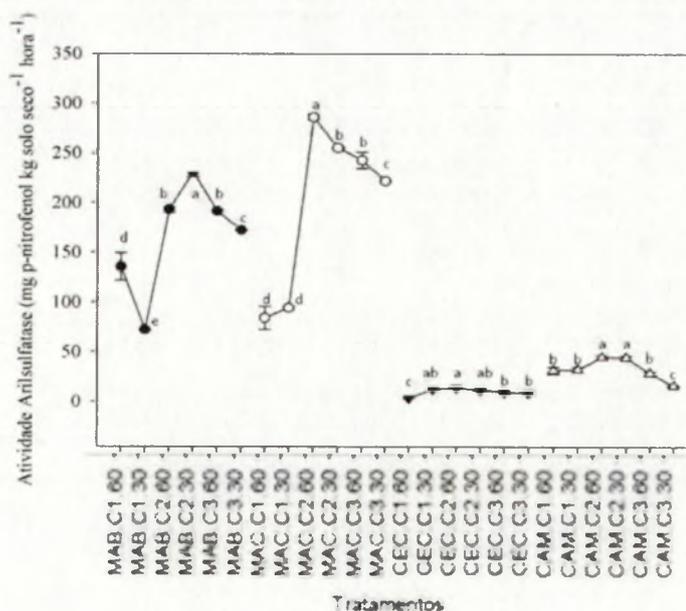


Figura 11 - Valores de atividade da arilsulfatase nos diferentes tratamentos Bertioga (MAB), Cananéia (MAC), Petrolina (CEC) e Mandacaru (CAM), atribuídos aos três ciclos sazonais e umidade. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si (Tukey $p \leq 0,05$)

Na análise da atividade da desidrogenase foi observada diferença significativa entre o solo de Mandacaru em relação aos outros três sítios ($p \leq 0,05$). Além da

diferença quanto aos três ciclos, principalmente para Mandacaru (Figura 12). Todos os ciclos de Mandacaru diferiram entre si, apresentando uma queda na atividade da desidrogenase. A atividade da desidrogenase apresentou correlação positiva com a fosfatase alcalina, arilsulfatase, amilase, urease, C e N totais e relação C/N, nos solos da Caatinga (Tabela 5).

Esta enzima está envolvida com a decomposição da matéria orgânica refletindo a atividade oxidativa total da microbiota do solo. Também está envolvida na geração de energia, através da cadeia de transporte de elétrons (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

O aumento da atividade da desidrogenase tem sido relacionado com a umidade do solo (QUILCHANO; MARANÓN, 2002). A taxa de infiltração de água, aeração e diminuição da porosidade podem estar relacionadas com a diminuição na atividade da desidrogenase nos solos (TAN; CHANG; KABZEMS, 2008). Vasconcellos (2012) relatou uma correlação negativa da umidade do solo e microporosidade com a atividade da desidrogenase. O autor observou que durante o verão, ou chuvoso, a atividade dessa enzima diminuiu. Nos sítios da Caatinga, a menor incidência de chuvas provavelmente favoreceu a atividade da desidrogenase.

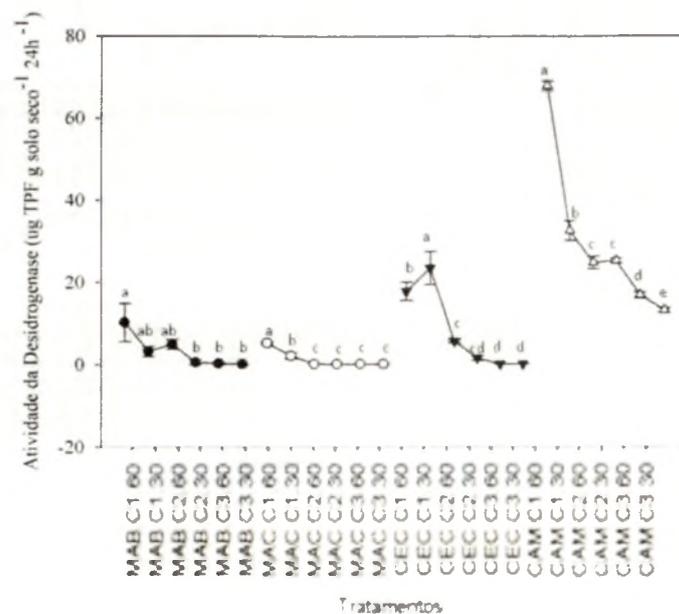


Figura 12 - Valores de atividade da desidrogenase nos diferentes tratamentos Bertioga (MAB), Cananéia (MAC), Petrolina (CEC) e Mandacaru (CAM), atribuídos aos três ciclos sazonais e umidade. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si (Tukey $p \leq 0,05$)

As atividades da celulase e amilase mostraram diferenças significativas entre os tratamentos nos sítios estudados (Figura 13). Os solos da Mata Atlântica apresentaram baixa atividade enzimática em relação aos solos da Caatinga. Essas enzimas apresentaram correlação entre si (Tabela 5). Gréggio e Nahas (2007) analisaram a atividade de amilase e celulase durante diferentes meses do ano e observaram que a maior taxa da atividade enzimática se deu nos períodos em que a incidência de chuva era menor. No verão, os autores relataram queda na atividade das enzimas, período que a ocorrência de chuva foi maior.

A celulose é um polissacarídeo bastante abundante na serrapilheira, portanto as celulases são importantes na decomposição do material vegetal (STUSOVÁ et al., 2012). Nos solos úmidos, os fungos são os micro-organismos celulolíticos predominantes, ao passo que nos solos das regiões mais secas as bactérias são os principais decompositores. A diversidade microbiana e a atividade metabólica podem interferir na atividade dessas enzimas (CUNHA-SANTINO; BIANCHINI Jr., 2007).

Os solos da Mata Atlântica em geral são extremamente úmidos, devido ao estrato arbóreo denso em que o solo recebe pouca luz (KINDEL; GARAY, 2002), assim a umidade do solo provavelmente sofre poucas oscilações e conseqüentemente, a microbiota encontra-se adaptada a essas condições. Ao passo que na Caatinga, os solos são extremamente secos, com ocorrência de períodos chuvosos definidos (SUDENE). Esse fato pode estar relacionado com a alta atividade dessa enzima nos sítios da Caatinga. Quando há ocorrência de chuva, os micro-organismos que estavam inativos são favorecidos com respostas rápidas a alta disponibilidade de água e surgem a partir da atividade dessas enzimas.

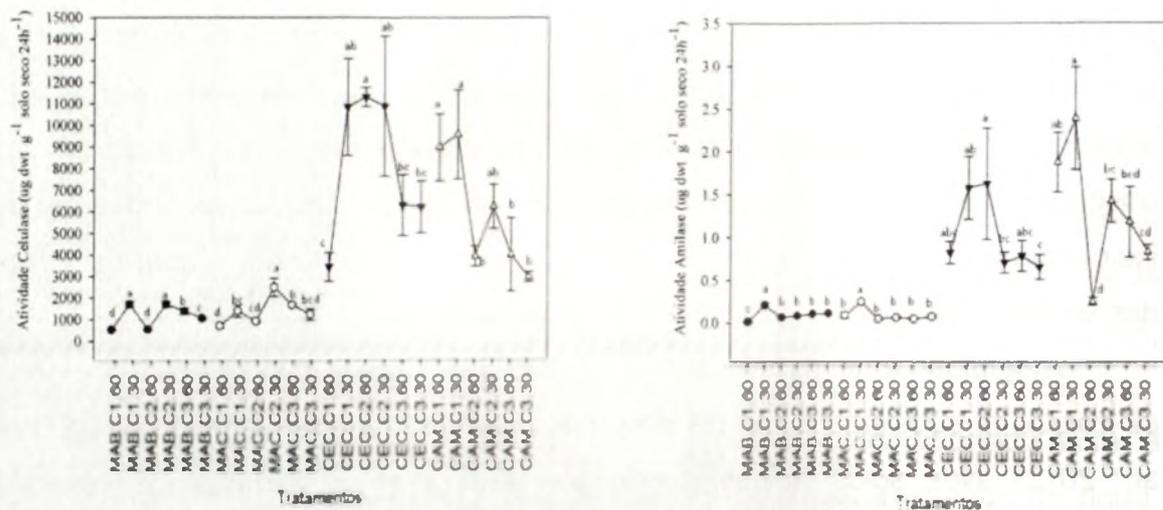


Figura 13 - Valores das atividades de celulase e amilase nos diferentes tratamentos Bertioiga (MAB), Cananéia (MAC), Petrolina (CEC) e Mandacaru (CAM), atribuídos aos três ciclos sazonais e umidade. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si (Tukey $p \leq 0,05$)

A atividade da urease apresentou diferença significativa entre os sítios, mostrando uma diferença entre os dois solos da Caatinga ($p \leq 0,05$). Os solos de Bertioiga, Cananéia e Petrolina apresentaram um declínio após os três ciclos de umidade. Entretanto, em Mandacaru, as taxas da atividade da urease foram superiores ao final do terceiro ciclo (Figura 14). Foi observada uma correlação positiva da atividade da urease com a fosfatase ácida, desidrogenase, arilsulfatase, C e N totais e relação C/N (Tabela 5).

A urease pode ser produzida por plantas e micro-organismos (principalmente bactérias) e está diretamente relacionada ao ciclo do N, responsável por hidrolisar a uréia, liberando CO_2 e amônia no solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Ciabotti (2013) observou uma correlação negativa entre a atividade da urease com a umidade do solo. O autor mostrou que a taxa na atividade da urease foi menor quanto maior foi o teor de umidade do solo. Porém, esses dados não foram semelhantes aos encontrados por Longo et al. (2005) que encontraram uma relação positiva entre a atividade da enzima e o teor de umidade do solo, de tal forma que nas épocas de alto teor de umidade a atividade da enzima urease foi maior.

A atividade da urease depende da umidade do solo (SOARES, 2011). Em solos secos a taxa de hidrólise da ureia é baixa, à medida que a umidade se eleva até alcançar 20 %, a hidrólise da ureia é alta e pouco se altera (BREMNER et al.,

1978). Além disso a elevação da temperatura e do pH do solo associados ao conteúdo de material orgânico, aumenta a atividade dessa enzima (SANTANA, 2011). Sendo assim a atividade da urease provavelmente não sofreu tanta influência da sazonalidade e sim de outros fatores físicos, químicos ou biológicos do solo. Neste sentido vários fatores como temperatura, pH e umidade podem estar associados a atividade dessa enzima no solo de Mandacaru.

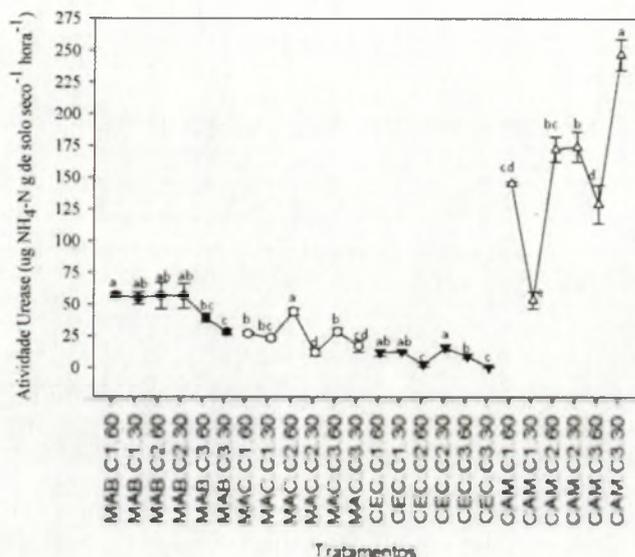


Figura 14 - Valores de atividade da urease nos diferentes tratamentos Bertioga (MAB), Cananéia (MAC), Petrolina (CEC) e Mandacaru (CAM), atribuídos aos três ciclos sazonais e umidade. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si (Tukey $p \leq 0,05$)

A atividade da fitase não apresentou diferença significativa entre os biomas Caatinga e Mata Atlântica. O ciclo um apresentou diferença significativa em relação aos demais ciclos (Figura 15). A atividade da fitase mostrou correlação positiva apenas com a arilsulfatase.

O fósforo orgânico representa cerca de 80 % do total de fósforo presentes no solo, sendo que aproximadamente 50 % estão na forma de fitato (HAYES et al., 2000). Para esse ser utilizado pela planta é necessário que seja hidrolisado pela enzima fitase (SILVA, 2012). Segundo o autor, a presença de micro-organismos com atividade da enzima fitase extracelular eficiente pode ser muito baixo nos solos, uma vez que em seu experimento não foram capazes de disponibilizar altas concentrações de fósforo inorgânico.

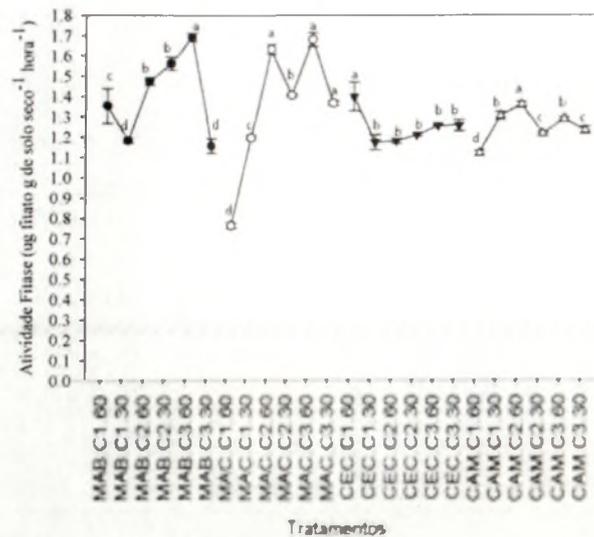


Figura 15 - Valores de atividade da fitase nos diferentes tratamentos Bertioga (MAB), Cananéia (MAC), Petrolina (CEC) e Mandacaru (CAM), atribuídos aos três ciclos sazonais e umidade. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si (Tukey $p \leq 0,05$)

Tabela 5 - Coeficiente de correlação entre os atributos microbiológicos dos dois biomas estudados. $p \leq 0,05$

| | Desidrogenase | Fosfatase ácida | Fosfatase alcalina | Arisulfatase | Celulase | Amilase | Fitase | Urease | C | N | C/N |
|--------------------|----------------------------------|-----------------|--------------------|--------------|------------|---------------|---------------|--------------|--------------|-----------|--------------|
| | Mat. Atlântica / Caatinga | | | | | | | | | | |
| Desidrogenase | ns / 0,78 | -0,61 / 0,65 | -0,66 / ns | ns / 0,50 | -0,30 / ns | 0,44 / 0,42 | ns / 0,65 | -0,27 / 0,54 | ns / 0,56 | | |
| Fosfatase ácida | | -0,49 / ns | ns / 0,56 | | -0,52 / ns | -0,43 / 0,66 | 0,38 / 0,61 | 0,5 / 0,66 | | | |
| Fosfatase alcalina | | | ns / 0,51 | | ns / 0,64 | | ns / 0,68 | ns / 0,44 | ns / 0,59 | | |
| Arisulfatase | | | | | -0,21 / ns | 0,72 / ns | ns / 0,65 | ns / 0,82 | 0,36 / 0,84 | ns / 0,44 | |
| Celulase | | | | | ns / 0,58 | ns / -0,58 | -0,39 / -0,49 | 0,27 / -0,36 | -0,29 / ns | | |
| Amilase | | | | | | -0,27 / -0,42 | | | ns / 0,41 | | |
| Urease | | | | | | | | -0,73 / 0,82 | -0,67 / 0,85 | ns / 0,41 | |
| C | | | | | | | | | 0,64 / 0,95 | ns / 0,54 | |
| N | | | | | | | | | | | -0,29 / 0,26 |

2.4.4 Grupos taxonômicos e atributos microbiológicos

Considerando as OTUs relacionadas ao efeito dos ciclos de umidade e os atributos microbiológicos avaliados, foram realizadas análises de correlação de Pearson, para entender a correlação das atividades enzimáticas com a comunidade bacteriana (Tabela 6, 7 e 8).

A família Rubrobacteraceae apresentou correlação positiva com a atividade da desidrogenase e fosfatase ácida ($r=0,77$ e $r=0,69$, $p \leq 0,05$) no solo da Caatinga. Esta família é comumente encontrada no solo, constituída de linhagens termofílicas, halofílicas, resistente a radiação gama e a dessecação (DUARTE, 2010; ALBUQUERQUE, 2014). Ainda no filo Actinobacteria, a família Frankiaceae, apresentou correlação com as enzimas desidrogenase, fosfatase alcalina e relação

C/N ($r= 0,46$, $r=0,67$ e $r=0,75$, $p\leq 0,05$). O gênero *Frankia* é encontrado principalmente associado simbioticamente com raízes de plantas (actinorrízicas), conduzindo a formação de estruturas nodulares onde ocorre a fixação biológica do N_2 (ANDRADE, 2007).

A família Flavobacteriaceae apresentou correlação com a enzima desidrogenase, amilase e urease ($r=0,78$, $r=0,53$ e $r=0,56$ $p\leq 0,05$). Membros dessa família atuam diretamente na degradação de compostos da serrapilheira (NDAW, 2007) degradando complexos ligno-celulolítico, consideradas fonte de energia para a comunidade microbiana (Mendonça; Loures, 1996). Há representantes dessa família, o gênero *Flavobacterium* descrito na literatura como um dos principais representantes do filo Bacteroidetes envolvido no ciclo do N, como fixadores de nitrogênio (GIRI; PATI, 2004) e participando do processo de desnitrificação (FIRESTONE, 1982). Esse gênero também foi reportado por Das, Lyla e Khan (2007) como solubilizadores de fosfato no solo.

O filo Proteobacteria foi o que apresentou o maior número de famílias correlacionadas com os atributos microbiológicos do solo. Na classe Betaproteobacteria, a família Alcaligenaceae apresentou correlação positiva com as enzimas desidrogenase, fosfatase alcalina, amilase e fitase e com o N total ($r=0,76$, $r=0,54$, $r=0,73$, $r=0,53$ e $r=0,58$, $p\leq 0,05$). Esse grupo detém de representantes que foram isoladas de raízes de plantas geralmente em solos alagados e ricos e matéria orgânica (DOBEREINER et al., 1995). Segundo o *Bergey's Manual* (2001) são aeróbias, mas podem reduzir nitrito, e consideradas quimiorganotróficas. Segundo Castro (2013) a família Comamonadaceae, também pertencente à classe Betaproteobacteria, em seu estudo foi representante do solo nos períodos de seca e chuva. Villegas (2014) relatou a presença dessas bactérias no processo de compostagem, consumindo carboidratos facilmente degradáveis. Neste estudo, esse grupo apresentou correlação com as enzimas desidrogenase e amilase ($r=0,79$ e $r=0,56$, $p\leq 0,05$).

A classe Alphaproteobacteria foi representada pela família Sphingomonadaceae, que apresentou correlação com as enzimas desidrogenase, fosfatase alcalina e celulase ($r=0,77$, $r=0,55$ e $r=0,53$, $p\leq 0,05$). Esse grupo apresenta metabolismo quimiorganotrófico, são bactérias estritamente aeróbias. Encontradas amplamente distribuídos na natureza, sendo isoladas de diferentes habitats, como solo, aquáticos e a partir de raízes de plantas e são metabolicamente

versáteis (BALKWILL et al., 2006). Assim como a família Rhodospirillaceae, também pertence à classe Alphaproteobacteria. Há relatos na literatura de espécies dessa família responsável pela oxidação de H_2S resultando em sulfato sem a formação intermediária de enxofre elementar (PAULINO, 2006). O gênero *Azospirillum* são comumente encontrados habitando raízes de plantas, colaborando com a sua nutrição, através da fixação biológica do nitrogênio ou produzindo hormônios vegetais (FLORES, 2015; MÜLLER, 2013, HUNGRIA, 2011). São bactérias promotoras de crescimento em planta, com capacidade de produzir ácidos orgânicos, que é o principal mecanismo para disponibilizar fósforo para as plantas (RODRIGUEZ, 2004). Essa família apresentou correlação positiva com as enzimas fosfatase ácida e celulase ($r=0,77$ e $r=0,57$, $p \leq 0,05$).

Hyphomicrobiaceae e Bradyrhizobiaceae (Alphaproteobacteria) são famílias pertencentes ao gênero Rhizobiales, conhecido por serem capazes de fixar nitrogênio em simbiose com as plantas, além de serem conhecidas como bactérias desnitrificantes (MADIGAN et al., 2010). Segundo estudos realizados por Henao (2010) a espécie *Hyphomicrobium denitrificans* pertencente à família Hyphomicrobiaceae foi associada ao processo de redução de sulfato. A família Hyphomicrobiaceae apresentou correlação positiva com a enzima arilsulfatase ($r=0,63$, $p \leq 0,05$) e a família Bradyrhizobiaceae com o C e N totais ($r=0,50$ e $r=0,54$, $p \leq 0,05$) no presente estudo.

A família Enterobacteriaceae são anaeróbios facultativos e quimiorganotróficos. Esse grupo apresentou correlação positiva com a fosfatase ácida e fitase ($r=0,84$ e $r=0,53$, $p \leq 0,05$). São ativas metabolicamente em uma faixa de temperatura de 25 a 30 °C (FELIPE, 2008). Gêneros pertencentes a essa família são conhecidos na literatura como solubilizadores de fosfato (SOUCHIE et al., 2005; SILVA-FILHO; VIDOR, 2000; KIM et al., 2003).

Tabela 6 - Coeficiente de correlação entre os grupos taxonômicos (filo e família) e atributos microbiológicos (desidrogenase, fosfatase ácida e alcalina e arilsulfatase) nos quatro sítios analisados (Bertioga- MAB; Cananéia- MAC; Petrolina- CEC; Mandacaru- CAM), $p \leq 0,05$

| Filo | Família | Atributos microbiológicos | | | |
|----------------------|-----------------------|---------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|
| | | Desidrogenase | Fosfatase ácida MAB/MAC/CEC/CAM | Fosfatase alcalina MAB/MAC/CEC/CAM | Arilsulfatase MAB/MAC/CEC/CAM |
| Acidobacteria | Solibacteraceae | -0,65/-0,62/0,55/ns | | ns/ns/0,82/ns | 0,48/ns/ns/ns |
| | Koribacteriaceae | | | | |
| | Acidobacteriaceae | ns/ns/0,51/ns/ns | | | |
| | Frankiaceae | ns/ns/ns/0,46 | -0,57/ns/ns/ns | 0,67/ns/ns/ns | ns/ns/ns/0,52 |
| | Mycobacteriaceae | ns/-0,60/-0,49/ns | ns/ns/ns/0,68 | ns/ns/0,49/ns | ns/ns/0,52/ns |
| Actinobacteria | Gaiellaceae | | | | |
| | Conexibacteraceae | ns/ns/-0,54/ns | | | |
| | Rubrobacteraceae | ns/ns/0,77/-0,49 | ns/ns/ns/0,69 | ns/ns/ns/-0,58 | |
| | Micromonosporaceae | ns/ns/-0,53/0,79 | | | ns/ns/ns/-0,71 |
| | Pseudonocardiaceae | ns/ns/-0,5/ns | | | |
| | Solirubrobacteraceae | ns/ns/ns/-0,55 | ns/ns/ns/0,74 | ns/ns/ns/-0,58 | ns/ns/ns/-0,59 |
| Bacteroidetes | Nocardioideaceae | | | | -0,71/-0,6/ns/ns |
| | Flavobacteriaceae | 0,78/0,57/ns/ns | | ns/ns/-0,55/ns | |
| Chloroflexi | Thermogemmatiporaceae | -0,68/ns/ns/ns | | | ns/-0,54/ns/ns |
| | Rhodochloroflexi | | | | ns/ns/ns/0,48 |
| Nitrospirae | Rhodochloroflexi | | | ns/0,37/ns/ns | ns/-0,42/-0,77/ns |
| | Nitrospiraceae | | | | 0,63/0,52/ns/ns |
| Proteobacteria | Oxalobacteraceae | 0,56/ns/0,48/ns | | | |
| | Hyphomicrobiaceae | -0,65/-0,62/ns/ns | | | |
| | Enterobacteriaceae | -0,60/-0,51/ns/-0,63 | ns/ns/ns/0,84 | ns/ns/ns/-0,75 | 0,51/0,54/ns/ns |
| | Alcaligenaceae | -0,62/-0,54/0,76/ns | | | |
| | Methylocystaceae | -0,63/ns/ns/ns | | ns/ns/ns/0,80 | ns/ns/0,57/ns |
| | Sinobacteraceae | | | | 0,6/ns/ns/ns |
| | Bradyrhizobiaceae | -0,55/-0,58/ns/ns | ns/ns/ns/0,77 | ns/ns/ns/-0,61 | ns/-0,66/ns/ns |
| | Rhodospirillaceae | ns/ns/ns/-0,53 | ns/ns/ns/-0,79 | | |
| | Comamonadaceae | ns/0,79/0,71/0,64 | | ns/ns/ns/0,55 | ns/ns/-0,58/ns |
| | Sphingomonadaceae | ns/ns/ns/0,77 | | | ns/ns/ns/0,58 |
| Burkholderiaceae | ns/ns/0,55/ns | | | ns/ns/ns/0,55 | |
| Coxiellaceae | | | | | |
| Syntrophobacteraceae | | | | | |

Tabela 7 - Coeficiente de correlação entre os grupos taxonômicos (filo e família) e atributos microbiológicos (celulase, amilase, fitase e urease) nos quatro sítios analisados (Bertioga- MAB; Cananéia- MAC; Petrolina- CEC; Mandacaru- CAM). $p \leq 0,05$

| Filo | Família | Celulase | Atributos microbiológicos | | | |
|----------------|-----------------------|--------------------|---------------------------|-------------------|-------------------|--|
| | | | Amilase | Fitase | Urease | |
| | | MAB/ MAC/ CEC/ CAM | | | | |
| Acidobacteria | Solibacteraceae | | | | -0,56/-0,47/ns/ns | |
| | Koribacteraceae | | 0,5/ns/0,56/ns | | | |
| | Acidobacteriaceae | | | ns/-0,47/ns/ns | 0,59/ns/ns/ns | |
| | Mycobacteriaceae | | | ns/0,54/ns/ns | | |
| | Gaiellaceae | | ns/ns/0,67/ns | ns/0,48/ns/ns | | |
| Actinobacteria | Conexibacteraceae | | ns/ns/-0,48/ns | | | |
| | Rubrobacteraceae | | | | | |
| | Micromonosporaceae | | ns/ns/-0,57/ns | ns/ns/ns/-0,65 | | |
| | Pseudonocardaceae | | | | ns/ns/ns/0,48 | |
| | Solirubrobacteraceae | | | | ns/ns/ns/0,52 | |
| Bacteroidetes | Nocardiodaceae | | | | ns/ns/ns/0,52 | |
| | Flavobacteriaceae | | ns/0,53/ns/ns | ns/-0,52/ns/ns | 0,56/ns/ns/ns | |
| Chloroflexi | Thermogemmatiporaceae | | | | -0,78/ns/ns/ns | |
| | Ktedonobacteraceae | | | -0,47/ns/ns/ns | -0,65/ns/ns/ns | |
| | Rhodochlamydiaceae | | | ns/-0,58/ns/ns | | |
| | Sphingobacteriaceae | ns/-0,48/ns/ns | | ns/-0,75/ns/-0,55 | | |
| Firmicutes | Bacillaceae | | | -0,54/ns/ns/ns | -0,54/ns/ns/-0,74 | |
| | Oxalobacteraceae | ns/ns/-0,52/ns | -0,47/0,66/ns/ns | ns/ns/0,72/ns | | |
| | Hyphomicrobiaceae | | | ns/0,55/ns/ns | -0,68/ns/ns/ns | |
| | Enterobacteriaceae | ns/ns/ns/-0,56 | ns/ns/-0,59/ns | ns/0,53/ns/ns | -0,74/ns/ns/ns | |
| | Alcaligenaceae | | ns/-0,53/0,73/ns | ns/0,53/ns/ns | | |
| | Methylocystaceae | | | | -0,55/ns/ns/ns | |
| | Sinobacteraceae | ns/ns/0,58/-0,47 | ns/ns/0,62/-0,62 | 0,52/ns/ns/ns | | |
| | Bradyrhizobiaceae | | | 0,5/0,51/ns/ns | | |
| Proteobacteria | Rhodospirillaceae | ns/0,57/ns/ns | | | -0,77/ns/ns/ns | |
| | Comamonadaceae | ns/-0,53/ns/ns | ns/ns/0,56/ns | ns/-0,73/ns/ns | | |
| | Sphingomonadaceae | ns/ns/ns/0,53 | | | | |
| | Burkholderiaceae | | | ns/ns/0,77/ns | | |
| | Beijerinckiaceae | | | | ns/ns/0,54/ns | |
| | Entotheonellaceae | | ns/ns/ns/-0,58 | ns/ns/ns/0,50 | | |

Tabela 8 - Coeficiente de correlação entre os grupos taxonômicos (filo e família) e atributos microbiológicos (desidrogenase, fosfatase ácida e alcalina e anilsulfatase) nos quatro sítios analisados (Bertioga- MAB; Cananéia- MAC; Petrolina- CEC; Mandacaru- CAM). $p \leq 0,05$

| Filo | Família | C | Atributos microbiológicos | | |
|----------------|---------------------|--------------------|---------------------------|----------------|--|
| | | | N | C/N | |
| | | MAB/ MAC/ CEC/ CAM | | | |
| Acidobacteria | Solibacteraceae | ns/0,58/ns/ns | | | |
| | mb2424 | | ns/ns/ns/0,53 | | |
| | Frankiaceae | | -0,60/ns/ns/ns | 0,75/ns/ns/ns | |
| Actinobacteria | Mycobacteriaceae | | | ns/ns/ns/-0,49 | |
| | Conexibacteraceae | ns/ns/-0,52/ns | | | |
| | Micromonosporaceae | ns/ns/ns/0,53 | | | |
| Firmicutes | Alicyclobacillaceae | ns/ns/0,48/ns | | | |
| | Oxalobacteraceae | | | | |
| Proteobacteria | Alcaligenaceae | | ns/0,58/ns/ns | | |
| | Bradyrhizobiaceae | 0,5/ns/ns/ns | 0,54/ns/ns/ns | -0,46/ns/ns/ns | |
| | Rhodospirillaceae | | | ns/ns/ns/-0,51 | |
| | Beijerinckiaceae | ns/ns/-0,60/ns | | | |

2.5 Conclusões/Considerações Finais

Os resultados apresentados no presente trabalho mostraram que a mudança ao longo dos ciclos de umidade inferiu alterações taxonômicas nas comunidades bacterianas e nas atividades das enzimas nos solos da Caatinga e da Mata Atlântica.

A composição taxonômica da comunidade bacteriana nos solos da Caatinga e da Mata Atlântica alterou significativamente com o efeito da umidade constatada pela análise da biblioteca gene 16S rRNA. A diferença entre a abundância relativa para os grupos taxonômicos em nível de filo (Acidobacteria, Proteobacteria e Chloroflexi para os solos da Mata Atlântica e Actinobacteria, Proteobacteria, Chloroflexi e Acidobacteria nos solos da Caatinga) e classe (Acidobacteria, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria e Gammaproteobacteria, para os solos da Mata Atlântica e Ktedonobacteria, Actinobacteria-6 e Betaproteobacteria, nos solos da Caatinga) foi observada entre os biomas. As atividades enzimáticas nos dois biomas, Caatinga e Mata Atlântica, mostraram alterações, quando expostas ao efeito do estresse hídrico. Os grupos taxonômicos pertencentes aos filos Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Firmicutes e Proteobacteria podem estar envolvidos nos ciclos de nutrientes essenciais para a manutenção do solo.

Por fim, o aquecimento global previsto para os próximos anos pode alterar a comunidade microbiana do solo, considerando a estrutura e funcionalidade. É de fundamental importância que trabalhos como este continuem sendo desenvolvidos, para entender se essas comunidades conseguem se adaptar a essas mudanças ambientais e se a partir dessa mudança as atividades enzimáticas se manterão no solo.

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry should be supported by a valid receipt or invoice. This ensures transparency and allows for easy verification of the data.

In addition, the document outlines the procedures for handling discrepancies. If there is a difference between the recorded amount and the actual amount received or paid, it is crucial to investigate the cause immediately. This could be due to a clerical error, a missing receipt, or a more serious issue like fraud.

The document also provides guidelines for the storage and security of financial records. All records should be kept in a secure location, protected from fire, theft, and unauthorized access. Regular backups should be performed to prevent data loss.

Finally, the document stresses the importance of regular audits. Conducting periodic audits helps to identify any irregularities or errors in the accounting system. This proactive approach can prevent small issues from becoming major problems.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, L.; COSTA, M.S. The family Rubrobacteraceae. In: ROSENBERG, E.; DELONG, E.F.; LORY, S.; STACKEBRANDT, E.; THOMPSON, F. **The prokaryotes**. Berlin; Heidelberg: Springer, 2014. p. 861-867.
- ALLAN, R.P.; SODEN, B.J. Atmospheric warming and the amplification of precipitation extremes. **Science**, Miami, v. 321, n. 5895, p. 1481-1484, 2008.
- AMES, B.N. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. In: NEUFELD, E.; GINSBURG, V. (Ed.). **Methods in enzymology**. New York: Academic Press, 1966. p. 115-118.
- ANDRADE, D.S.; ATAÍDE, L.T.; SOUZA, J.R.P.; GOES, K.C.G.P.; MORITZ, P. Caracterização morfológica, fisiológica e infectividade em planta de estirpes de *Frankia* isoladas de nódulos de Casuarina. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 4, p. 597-608, out./dez. 2007.
- ARAÚJO, A.S.F.; MONTEIRO, R.T.R. Biological indicators of soil quality. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, n. 3, p. 66-75, 2007.
- ARAÚJO, S.P. **Atributos biológicos do solo sob diferentes coberturas vegetais amostrados em duas estações do ano numa topossequência no Noroeste Fluminense – RJ**. 2003. 63 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2003.
- BACHAR, A.; AL-ASHHAB, A.; SOARES, M.I.; SKLARZ, M.Y.; ANGEL, R.; UNGAR, E.D.; GILLOR, O. Soil microbial abundance and diversity along a low precipitation gradient. **Microbial Ecology**, New York, v. 60, p. 453-461, 2010.
- BALDRIAN, P.; SNAJDR, J.; MERHAUTOVÁ, V.; DOBIÁSOVÁ, P.; CAJTHAML, T.; VALÁSKOVÁ, V. Responses of the extracellular enzyme activities in hardwood forest to soil temperature and seasonality and the potential effects of climate change. **Soil Biology & Biochemistry**, Praga, v. 56, p. 60-68, 2013.
- BALKWILL, D.L.; FREDRICKSON, J.K.; ROMINE, M.F. Sphingomonas and related genera. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.H.; STACKEBRANDT, E. (Ed.). **The prokaryotes**. New York: Springer Verlag, 2006. p. 605-629.
- BARNARD, R.L.; OSBORNE, C.A.; FIRESTONE, M.K. Responses of soil bacterial and fungal communities to extreme desiccation and rewetting. **ISME Journal**, Dijon, v. 7, p. 2229-2241, 2013.
- BERG, B. Litter decomposition and organic matter turnover in northern forest soils. **Forest Ecology and Management**, Bayreuth, v. 133, p. 13- 22, 2000.

BLAINE, F.; SKLADANY, G.J.; METTING Jr, F. B. Bioremediation of contaminated soil. Soil microbial ecology: applications in agricultural and environmental management. **Books in Soils, Plants, and the Environment**, New York, p. 483-513, 1992.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Programa de ação nacional de combate à desertificação e mitigação dos efeitos da seca Pan-Brasil**. Brasília, 2004. 220 p.

_____. **Caatinga**. 2012. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga>>. Acesso em: 04 set.2015.

_____. **Mata Atlântica**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/mata-atlantica>>. Acesso em: 05 set.2015.

BREMNER, J.M.; MULVANEY, R.L. Urease activity in soils. In: BURNS, R.G. (Ed.). **Soil enzymes**. London: Academic Press, 1978. p. 149-196.

BRODIE, E.L.; DESANTIS, T.Z; PARKER, J.P; ZUBIETTA, I.X; PICENO, Y.M; ANDERSEN, G.L.. Urban aerosols harbor diverse and dynamic bacterial populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 104, p. 299–304, 2007.

BRUCE, T.; MARTINEZ, I.B.; MAIA NETO, O.; VICENTE, A.C.; KRUGER, R.H.; THOMPSON, F. L. Bacterial community diversity in the Brazilian Atlantic forest soils. **Microbial Ecology**, Rio de Janeiro, v. 60, n. 4, p. 840-849, 2010.

CAPORASO, J.G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F.; COSTELLO, E.K.; FIERER, N.; PEÑA, A.G.; GOODRICH, J.K.; GORDON, J.I.; HUTTLEY, G.A.; KELLEY, S.T.; KNIGHTS, D.; KOENIG, J.E.; LEY, R.E.; LOZUPONE, C.A.; MCDONALD, C. MUEGGE, B.D.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J.R.; TURNBAUGH, P.J.; WALTERS, W.A.; WIDMANN, J. YATSUNENKO, ZANEVELD, J.; KNIGHT, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, London, v. 7, p. 335–336, 2010.

CARSON, J.K.; GONZALEZ-QUIÑONES, V.; MURPHY, D.V.; HINZ, C.; SHAW, J.A.; GLEESON, D.B. Low pore connectivity increases bacterial diversity in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Crawley, v. 12, p. 3936–3942, 2010.

CARVALHO, V.G. **Diversidade de fungos do solo da Mata Atlântica**. 2012. 203 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

CASIDA, L.E.; KLEIN, D.A.; SANTORO, T. Soil dehydrogenase activity. **Soil Science**, Lincoln, v. 98, p. 371-376, 1964.

CASTRO, A.P. **Efeito da disponibilidade de água na composição e função de comunidades microbianas presentes no solo do Cerrado revelado por análises metagenômicas**. 2013. 127 p. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

CERRI, C.C.; CERRI, C.E.P.; DAVIDSON, E.A.; BERNOUX, M.; FELLER, C.A. Ciência do solo e o sequestro de carbono. **Boletim Informativo da Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 29, p. 29-34, 2004.

CHEN, Y.; REKHA, P.; ARUN, A.; SHEN, F.; LAI, W.; YOUNG, C. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. **Applied Soil Ecology**, Taichung, v. 34, p. 33-41, 2006.

CIABOTTI, E.D. **Atributos Microbiológicos, químicos e granulométricos de organossolo e latossolos vermelhos: efeito sazonal e uso do solo**. 2013. 99 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2013.

CRICQUET, S.; FERRE, E.; FARNET, A.M.; LE PETIT, J. Annual dynamics of phosphatase activities in an evergreen oak litter: influence of biotic and abiotic factors. **Soil Biology & Biochemistry**, Marseille, v. 36, n. 7, p. 1111-1118, 2004.

CUNHA-SANTINO, M.B.; BIANCHINI JR., I. The aerobic and anaerobic decomposition of *Typha domingensis* Pers. **Acta Limnologica Brasiliensia**, São Carlos, v. 18, p. 321-334. 2006.

DAS, S.; LYLA, P.S.; KHAN, A. Biogeochemical processes in the continental slope of Bay of Bengal: I. Bacterial solubilization of inorganic phosphate. **Revista de Biologia Tropical**, Tamil Nadu, v. 55, n. 1, p. 1-9, 2007.

DICK, R.P.; BREAKWELL, D.P.; TURCO, R.F. Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrative microbiological indicators. In: DORAN, J.W.; JONES, A.J. (Ed.). **Methods for assessing soil quality**. Madison: Soil Science Society of America, 1996. p. 247-272.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: EMBRAPA, SPI; Seropédica: EMBRAPA, CNPAB, 1995. 60 p.

DORAN, J.W.; PARKIN, T.B. Defining and assessing soil quality. In: DORAN, J.W.; COEMAN, D.C.; BEZDICEK, D.F.; STEWART, B.A. (Ed). **Defining soil quality for sustainable environment**. Madison: Soil Science Society of America, 1994. p. 3-21.

DUARTE, T.D.D. **Micro-organismos em ambientes criogênicos: gelo glacial, solos expostos por recuo de geleiras, e permafrost polares**. 2010. 200 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto Butantã, São Paulo, 2010.

FAITH, D.P. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. **Biological Conservation**, Lyneham, v. 61, p.1-10, 1992.

FAORO, H.; ALVES, A.C.; SOUZA, E.M.; RIGO, L.U.; CRUZ, L.M.; AL-JANABI, S.M.; MONTEIRO, R.A.; BAURA, V.A. Influence of soil characteristics on the diversity of bacteria in the Southern Brazilian Atlantic Forest. **Applied and Environmental Microbiology**, Curitiba, v. 14, p. 4744-4749, 2010.

FELIPE, L.M. **Associação de bactérias da família *Enterobacteriaceae* e *Clostridium estertheticum* com a deterioração “blown pack” em cortes cárneos embalados a vácuo.** 2008. 73 p. Dissertação (Mestrado em Veterinária Preventiva) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2008.

FERREIRA, C. **Dinâmica do microbioma da rizosfera de mandacaru na Caatinga.** 2012. 88 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

FIERER, N.; SCHIMEL, J.P.; HOLDEN, P.A. Influence of drying: rewetting frequency on soil bacterial community structure. **Microbial Ecology**, New York, v. 45, p. 63-71, 2003.

FIRESTONE, M.K. Biological denitrification. In: STEVENSON, F.J. **Nitrogen in agricultural soils.** Madison: American Society Agronomy, 1982. p. 289-326.

FITTER, A.H.; GILLIGAN, C.A.; HOLLINGWORTH, K.; KLECZKOWSKI, A.; TWYMAN, R.M.; PITCHFORD, J.W. Biodiversity and ecosystem function in soil. **Functional Ecology**, Cambridge, v. 19, p. 369-377, 2005.

FLORES, S.W.S. **Composição e funcionalidade do microbioma da rizosfera de feijão selvagem e cultivado.** 2015. 150 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

FROSSARD, A.; RAMOND, J.B.; SEELY, M.; COWAN, D.A. Water regime history drives responses of soil Namib Desert microbial communities to wetting events. **Scientific Reports**, Pretoria, v. 5, p. 1-13, 2015.

GALINDO, I.C.L. **Relações solo-vegetação em áreas sob processo de desertificação no Estado de Pernambuco.** 2007. 248 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2007.

GARRIDO, J.F.A.; LUGO, D.M. Bacterial community structure in the rhizosphere of three cactus species from semi-arid highlands in central Mexico. **Antonie van Leeuwenhoek**, Mexico City, v. 101, p. 891-904, 2012.

GARRITY, G.M. (Org.). **Bergey’s manual of systematic bacteriology.** 2nd ed. New York: Springer US, 2001. 722 p.

GIRI, S.; PATI, B.R. A comparative study on phyllosphere nitrogen fixation by newly isolated *Corynebacterium* sp. & *Flavobacterium* sp. and their potentialities as biofertilizer. **Acta Microbiologica Hungarica**, Budapest, v. 51, n. 1, p. 47- 56, 2004.

GIULIETTI, A.M.; HARLEY, R.; QUEIROZ, L.P.; RAPINI, A. To set the scene. In: QUEIROZ, L.P.; RAPINI, A.; GIULIETTI, A.M. (Ed). **Towards greater knowledge of the Brazilian semi-arid biodiversity.** Brasília: Ministério de Ciência e Tecnologia, 2006. p. 11-15.

GRÉGGIO, T.C.; NAHAS, E. Atividade enzimática do solo sob dois fragmentos florestais. **Científica**, Jaboticabal, v. 35, n. 2, p. 179-187, 2007.

GTARI, M.; ESSOUSSI, I.; MAAOUI, R.; SGHAIER, H.; BOUJMIL, R. Contrasted resistance of stone-dwelling Geodermatophilaceae species to stresses known to give rise to reactive oxygen species. **FEMS Microbiology Ecology**, Sidi Thabet, v. 80, p. 566–577, 2012.

HAGEN, J.B. The origins of bioinformatics. **Nature Reviews Genetics**, Virginia, v. 1, n. 3, p. 231-236, 2000.

HALSEY, J.A. **Diversidade de bactérias associadas aos cogumelos de Mata Atlântica no Estado de São Paulo**. 2012. 114 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

HE, Z. Development and application of functional gene arrays for microbial community analysis. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China**, Oklahoma, v. 18, n. 6, p. 1319-1327, 2008.

HENAO, D.M.O. **Estudo de genes envolvidos no processo de adesão do *Acidithiobacillus ferrooxidans* em calcopirita (CuFeS₂)**. 2010. 132 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Araraquara, 2010.

HERNANI, L.C. **Micro-organismos**. Brasília: Agência Embrapa de Informação Tecnológica, [s.d.]. 145p.

HOFFMANN, F.L. Fatores limitantes à proliferação de micro-organismos em alimentos. **Brasil Alimentos**, São Paulo, n. 9, p. 23-30, 2001.

HUBERT, C.; LOY, A.; NICKEL, M. A constant flux of diverse thermophilic bacteria into the cold Arctic seabed. **Science**, Washington, v. 325, p. 1541-1544, 2009.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: EMBRAPA Soja, 2011. 36 p.

INSTITUTO NACIONAL DO SEMIARIDO. **Desertificação e mudanças climáticas no semiárido brasileiro**. Campina Grande, 2011. 209 p.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. **2005**: second assessment report – climate change: a report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Geneva, 1995.

_____. **2007**: impacts, adaptation and vulnerability; contribution of working group II to the Fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. New York, 2008. p. 338-353.

JAOUANI, D.A.; NEIFAR, M.; HAMZA, A.; CHAABOUNI, S.; MARTINEZ, J.; GTARI, M. Purification and characterization of a highly thermostable esterase from the actinobacterium *Geodermatophilus obscures* strain G20. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 52, p. 1- 8, 2012.

JEFFRIES, T.C.; SEYMOUR, J.R; GILBERT, J.A.; DINSDALE, E.A.; NEWTON, K.; LETERME, S.S. Substrate type determines metagenomic profiles from diverse chemical habitats. **PLoS ONE**, Paris, v. 6, e25173, 2011.

KURAMAE, E.E.; YERGEAU, E.; WONG, L.C.; PIJL, A.S.; VAN VEEN, J.A.; KOWALCHUK, G.A Soil characteristics more strongly influence soil bacterial communities than land-use type. **Fems Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 79, n. 1, p. 12-24, 2012.

KAVAMURA, V.N. **Bactérias associadas às cactáceas da Caatinga: promoção de crescimento de plantas sob estresse hídrico.** 2012. 244 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

KAVAMURA, V.N.; TAKETANI, R.G.; LANÇONI, M.D.; ANDREOTI, F.D.; MENDES, R.; MELO, I.S. Water regime influences bulk soil and rhizosphere of *Cereus jamacaru* bacterial communities in the Brazilian Caatinga biome. **PloS one**, San Francisco, v. 8, n. 9, p. 73, 2013a.

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

KIM, C.H.; HAN, S.H.; KIM, K.Y.; CHO, B.H.; KIM, Y.H.; KOO, B.S.; KIM, Y.C. Cloning and Expression of Pyrroloquinoline Quinone (PQQ) Genes from a Phosphate-Solubilizing Bacterium *Enterobacter intermedium*. **Current Microbiology**, Gwangju, v. 47, p. 457– 461, 2003.

KINDEL, A.; GARAY, I. Humus form in ecosystems of the Atlantic Forest, Brazil. **Geoderma**, Rio de Janeiro, v. 108, p. 101-118, 2002.

LAL, R.; KIMBLE, J.M.; FOLLETT, R.F.; COLE, C.V. The potential of U.S. cropland to sequester carbon and mitigate the greenhouse effect. **Sleeping Bear Press**, Ottawa, v. 2, p. 177-185, 1998.

LEE, S.H.; KA, J.O.; CHO, J.C. Members of the phylum Acidobacteria are dominant and metabolically active in rhizosphere soil. **FEMS Microbiology Letters**, Yongin, v. 228, p. 263-269, 2008.

LIMA, J.E **Diversidade de bactéria e Archaea em solos de Mata Atlântica no estado de São Paulo.** 2011. 83 p. Dissertação (Mestre em Microbiologia Agrícola)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

LINN, D.M.; DORAN, J.W. Effect of water-filled pore space on carbon dioxide and nitrous oxide production in tilled and non-tilled soils. **Soil Science Society of America Journal**, Amsterdam, v. 48, n. 6, p. 1267-1272, 1984.

LONGO, R.M.; MELO, W.J. Atividade da urease em latossolos sob influência da cobertura vegetal e da época de amostragem. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 29, n. 4, p. 645-650, 2005.

LOPES, J.F.B.; NADRADE, E.M.; LOBATO, F.A.O.; PALÁCIO, H.A.Q.; ARRAES, F.D.D. Deposição e decomposição de serrapilheira em área de Caatinga. **Revista Agro@mbiental Online**, Boa Vista, v. 3, n. 2, p. 72-79, 2009.

LOPES, N. **Distribuição geográfica de árvores da Mata Atlântica pode cair 65% até 2100**. Agência FAPESP. Disponível em: <http://agencia.fapesp.br/distribuicao_geografica_de_arvores_da_mata_atlantica_pode_cair_65_ate_2100/17761/>. Acesso em: 20 set. 2015.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de brock**. 3rd ed. Cidade: Prentice-Hall, 2010. 624 p.

MARENGO, J.A.; AMBRIZZI, T.; ROCHA, R.P.; ALVES, L.M.; CUADRA, S.V.; VALVERDE, M.C.; TORRES, R.R.; SANTOS, D.C.; FERRAZ, S.E.T. Future change of climate in South America in the late twenty-first century: intercomparison of scenarios from three regional climate models. **Climate Dynamics**, São Paulo, v. 35, n. 6, p. 1073-1097, 2010.

MARTINS, J.L.; SILVEIRA, T.S.; SILVA, K.T.; LINS, U. Salinity dependence of the distribution of multicellular magnetotactic prokaryotes in a hypersaline lagoon. **International Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 12, p. 193-201, 2009.

MATHUR, J.; BIZZOCO, R.W.; ELLIS, D.G.; LIPSON, D.A.; POOLE, A.W.; LEVINE, R.; KELLEY, S.T. Effects of abiotic factors on the phylogenetic diversity of bacterial communities in acidic thermal springs. **Applied and Environmental Microbiology**, San Diego, v. 73, p. 2612-2623, 2007.

MELO, A.S. O que ganhamos 'confundindo' riqueza de espécies e equabilidade em um índice de diversidade? **Biota Neotropical**, Porto Alegre, v. 3, p. 21-27, 2008.

MELO, M.R.F.; MANTOVANI, W. Composição florística e estrutura fitossociológica da mata atlântica de encosta na Ilha do Cardoso (Cananéia, SP, Brasil). **Brazilian Institute of Botany**, São Paulo, v. 9, p. 107-158, 1994.

MENDES, I.C.; REIS, F.B.J.; CUNHA, M.H. **20 Perguntas e respostas sobre fixação biológica de nitrogênio**. Planaltina: Embrapa cerrados, 2010. 33 p.

MENDONÇA, E.S.; LOURES, E.G. Matéria orgânica do solo. In: MENDONÇA, E.S. **Apostila de fertilidade do solo**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1996. p. 118-147.

METZGER, J.P. Conservation issues in the Brazilian Atlantic forest. **Biological Conservation**, São Paulo, v. 6, p. 1138-1140, 2009.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729 p.

MOURA, Q.L.; RUIVO, M.L.P.; RODRIGUES, H.J.B.; ROCHA, E.J.P.; JUNIOR, J.A.S.; VASCONCELOS, S.S.; ANDRADE, M.C.; MANES, C.L.O. Variação sazonal da população de bactérias e fungos e dos teores de nitrato e amônio do solo nos sítios do LBA e PPBIO, na Amazônia Oriental. **Revista Brasileira de Meteorologia**, Santarém, v. 30, n. 3, p. 265-274, 2015.

MÜLLER, T.M. **Inoculação de *Azospirillum brasilense* associada a níveis crescentes de adubação nitrogenada e o uso de bioestimulante vegetal na cultura do milho**. 2013. 84 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2013.

NDAW, S.M. **Atividade e funcionalidade das comunidades nitrificadoras, desnitrificadoras e fixadoras de nitrogênio em solo sob diferentes coberturas vegetais na região do estado do Rio de Janeiro**. 2007. 133 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2007.

NIE, G.X.; MING, H.; LI, S.; ZHOU, E.M.; CHENG, J.; YU, T.T.; ZHANG, J.; FENG, H.G.; TANG, S.K.; LI, W.J. *Geodermatophilus nigrescens* sp. nov., isolated from a dry-hot valley. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 101, p. 811-817, 2012.

NOBRE, C.A.; ASSAD, E.D.E.; OYAMA, M.D. "Mudança ambiental no Brasil: o impacto do aquecimento global nos ecossistemas da Amazônia e na agricultura". **Scientific American Brasil**, São Paulo, n. 12, p. 70-75, set. 2005.

NOBRE, P. Mudanças climáticas e desertificação: os desafios para o estado brasileiro. In: LIMA, C.C.L.; CAVALCANTE, A.M.B.; MARIN, A.M.P. (Ed.). **Desertificação e mudanças climáticas no semiárido brasileiro**. Campina Grande: Instituto Nacional do Semiárido, 2011. p. 25-35.

NOGUEIRA, M.A.; MELO, W.J. Enxofre disponível para a soja e atividade de arilsulfatase em solo tratado com gesso agrícola. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Jaboticabal, v. 27, n. 4, p. 655-663, 2003.

OLIVEIRA, S.A.; SOUZA, B.; AUAD, A.M.; SILVA, D.M.; CARVALHO, C.A. Desenvolvimento e Reprodução de *Sipha flava* (Forbes) (Hemiptera:Aphididae) em diferentes temperaturas. **Neotropical Entomology**, Lavras, v. 38, p. 311-316, 2009.

PACCHIONI, R.G. **Metagenômica comparativa de solo de regiões de Mata Atlântica e Caatinga do Estado do Rio Grande do Norte- Brasil**. 2010. 45 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

- PACCHIONI, R.G.; CARVALHO, F.M.; THOMPSON, C.E.; FAUSTINO, A.L.F.; NICOLINI, F.; PEREIRA, T.S.; SILVA, R.C.B.; CANTÃO, M.E.; GERBER, A.; VASCONCELOS, A.T.R.; AGNEZ-LIMA, L.F. Taxonomic and functional profiles of soil samples from Atlantic forest and Caatinga biomes in northeastern Brazil. **MicrobiologyOpen**, Bruxelas, v. 3, p. 299-315, 2014.
- PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORREA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M. 2002. Controle biológico: uma visão inter e multidisciplinar. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORREA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (Ed.). **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002. p. 125-142.
- PAULA, F.S. **Diversidade e estrutura funcional de comunidades microbianas em solos da Amazônia e resposta a mudanças na forma de uso do solo**. 2012. 107 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- PAULINO, C.Z. **Produção de biomassa por *Rubrivivax gelatinosus* em efluente de abatedouro avícola utilizando métodos industriais**. 2006. 75 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araçatuba, 2006.
- PINTO-COELHO, R.M. **Fundamentos em ecologia**. Porto Alegre: Artmed, 2007. 256 p.
- PLACELLA, S.A.; BRODIE, E.L.; FIRESTONE, M.K. Rainfall-induced carbon dioxide pulses result from sequential resuscitation of phylogenetically clustered microbial groups. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 109, n. 27, p. 10931-10936, 2012.
- POUNDS, A.; CARNAVAL, A.C.O.Q.; CORN, S. Climate change, biodiversity loss, and amphibian declines. In: GASCON, C.; COLLINS, J.P.; MOORE, R.D.; CHURCH, D.R.; MCKAY, J.E.; MENDELSON, J.R. III (Ed.). **Amphibian conservation action plan: IUCN/SSC Amphibian Specialist Group**. Cambridge: Glands, 2007. 64 p.
- QUILCHANO, C.; MARAÑÓN, T. Dehydrogenase activity in Mediterranean forest soils. **Biology and Fertility of Soils**, Seville, v. 35, p. 102-107, 2002.
- RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, Lyon, v. 151, p. 167-177, 2000.
- REICOSKY, D.C.; LINDSTROM, N.J. Fall tillage method: effect on short-term carbon dioxide flux from soil. **Agronomy Journal**, Madison, v. 85, p. 1237-1245, 1993.
- RICHARDSON, A.E.; HADOBAS, P.A.; HAYES, J.E. Acid phosphomonoesterase and phytase activities of wheat (*Triticum aestivum* L) roots and utilization of organic phosphorus substrates by seedlings grown in sterile culture. **Plant Cell Environmental**, Camberra, v. 23, p. 397-405, 2000.

RODRIGUES, T.B. **Diversidade metagenômica microbiana de biomas terrestres e marinhos**. 2011. 250 p. Tese (Doutorado em Genética) - Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

SÁ, I.B.; RICHE, G.R.; FOTIUS, G.A. As paisagens e o processo de degradação do semi-árido nordestino. In: SILVA, J.M.C.; FONSECA, M.T.; LINS, L.V. (Ed.). **Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2003. pt. 1, p. 17-36.

SAIKI, R.K. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, Emeryville, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SAIT, M.; DAVIS, K.E.R.; JANSSEN, P.H. Effect of pH on isolation and distribution of members of subdivision 1 of the phylum Acidobacteria occurring in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Victoria, v. 72, n. 3, p. 1852–1857, 2006.

SALAZAR, S.; SÁNCHEZ, L.E.; ALVAREZ, J.; VALVERDE, A.; GALINDO, P.; IGUAL, J.M.; PEIX, A.; SANTA-REGINA, I. Correlation among soil enzyme activities under different forest system management practices. **Ecological Engineering**, Salamanca, v. 37, p. 1123-1131, 2011.

SANTANA, I.K.S. **Atividade de ureases em solos e avaliação de potenciais inibidores**. 2011. 42 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

SANTOS, H.; LAMOSA, P.; COSTA, M.S. Extremófilos: micro-organismos à prova de agressões ambientais extremas. **Boletim de Biotecnologia**, Oeiras, n. 69, p. 2-10, 2001.

SCHINNER, F.; VON MERSI, W. Xylanase, CM-cellulase and invertase activity in soil: an improved method. **Soil Biology and Biochemistry**, Innsbruck, v. 22, p. 511-515, 1990.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Metagenomics for studying unculturable microorganisms: cutting the Gordian knot. **Genome Biology**, Madison, v. 6, p.229, 2005.

_____. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Massachusetts, v. 75, p. 7537–7541, 2009.

SEYBOLD, C.A.; HERRICK, J.E.; BREDJA, J.J. Soil resilience: a fundamental component of soil quality. **Soil Science**, Madison, v. 164, p. 224-233, 1998.

SILVA, C.F.; PEREIRA, M.G.; MIGUEL, D.L.; FEITORA, J.C.F.; LOSS, A.; MENEZES, C.E.G.; SILVA, E.M.R. Carbono orgânico total, biomassa microbiana e atividade enzimática do solo de áreas agrícolas, florestais e pastagem no Médio Vale do Paraíba do Sul (RJ). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 36, n. 6, p. 1680-1689, 2012.

SILVA, M.R.S.S. **Diversidade de comunidades bacterianas de solo de Cerrado em resposta a diferentes alterações dos ecossistemas**. 2012. 140 p. Tese (Doutorado em Ecologia)- Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

SILVA, R.C.; PEREIRA, J.M.; ARAUJO, Q.R.; PIRES, A.J.V.; DEL REI, A.J. Alterações nas propriedades químicas e físicas de um Chernossolo com diferentes coberturas vegetais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 31, p. 101-107, 2007.

SILVA-FILHO, G.N.; NARLOCH, C.; SCHARF, R. Solubilização de fosfatos naturais por micro-organismos isolados de cultivos de *Pinus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 6, p. 847-854, 2002.

SOARES, J.R. **Nitrificação na volatilização de NH₃ pela aplicação superficial de uréia no solo**. 2011. 79 p. Dissertação (Mestre em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agrônomo, Campinas, 2011.

SOGIN, M.L.L.; HILARY, G. M.; HUBER, H.A.; WELCH, D.M.; HUSE, S.M.; NEAL, P.R.; ARRIETA, J.M; HERNDL, G.J. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 103, p.12115-12120. 2006.

SOLOMON, S.D.; QIN, M.; MANNING, Z.; CHEN, M.; MARQUIS, K.B.; AVERYT, M.; MILLER, H.L. **Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. New York: Cambridge University Press, 2007. 996 p.

SOS MATA ATLÂNTICA. **A Mata Atlântica**. Disponível em: <https://www.sosma.org.br/nossa-causa/a-mata-atlantica/>. Acesso em: 22 out. 2015.

SOUCHIE, E.L.; AZCÓN, R.; BAREA, J.M.; SAGGIN-FILHO, O.J.; SILVA, E.M.R. Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 11, p. 1149-1152, 2005.

SUPERINTENDÊNCIA DE DESENVOLVIMENTO DO NORDESTE. **Caracterização do semi-árido brasileiro**. 1997. Disponível em: <<http://www.sudene.gov.br/acesso-a-informacao/institucional/area-de-atuacaoda-sudene/semiarido>>. Acesso em: 22 out 2015.

STURSOVÁ, M.; ZIFCÁKOVÁ, L.; LEIGH, M.B.; BURGESS, R.; BALDRIAN, P. Cellulose UTILIZATION in forest litter and soil: identification of bacterial and fungal decomposers. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 80, p. 735- 746, 2012.

TABATABAI, M.A. Soil enzymes. In: BLACK, C. A. (Ed.) **Methods of soil analysis chemical and microbiological properties**. Madison: American Society of Agronomy, 1982. pt. 2: p. 903-947.

_____. Soil enzymes. In: WEAVER, R.W.; ANGLE, S.; BOTTOMLEY, P.; BEZDICEK, D.; SMITH, S.; TABATABAI, A.; WOLLUM, A. **Methods of soil analysis: microbiological and biochemical properties**. Madison: Soil Science Society of America, 1994. p. 775-833.

TABATABAI, M.A.; BREMNER, J.M. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. **Soil Biology & Biochemistry**, Ames, v. 1, p. 301-307, 1969.

_____. Arylsulphatase activity in soils. **Soil Science Society of America Proceedings**, Madison, v. 34, p. 225-229, 1970.

_____. Assay of urease activity in soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Ames, v. 4, n. 4, p. 479-487, 1972.

TAKETANI, R.G.; KAVAMURA, V.N.; MENDES, R.; MELO, I.S. Functional congruence of rhizosphere microbial communities associated to leguminous tree from Brazilian semiarid region. **Environmental Microbiology Reports**, (Jaguariúna) v. 7, p. 95-101, 2014.

TAN, X.; CHANG, S.X.; KABZEMS, R. Soil compaction and forest floor removal reduced microbial biomass and enzyme activities in a boreal aspen forest soil. **Biology and Fertility Soils**, Edmonton, v. 44, p. 471- 479, 2008.

TER BRAAK ŠMILAUER, P.; CANOCO, C.J.F. **Reference manual and canodraw for windows user's guide: software for canonical community ordination; version 4.5**. New York, 2002. 500 p.

TRINGE, S.G.; VON MERING, C.; KOBAYASHI, A.; SALAMOV, A.A.; CHEN, K.; CHANG, H.W. Comparative metagenomics of microbial communities. **Science**, New York, v. 308, p. 554–557, 2005.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME. Land. In: _____. **Global environment outlook: environment for development (GEO-4)**. Section B State-and-Trends of the Environment: 1987-2007. Nairobi, 2007. p. 39-192.

VARGAS, R.; COLLINS, S.L.; THOMEY, M.L.; JOHNSON, J.E.; BROWN, R.F.; NATVIG, D.O. Precipitation variability and fire influence the temporal dynamics of soil CO₂ efflux in an arid grassland. **Global Change Biology**, Ensenada, v. 18, p. 1401–1411, 2012.

VARJABEDIAN, R. Atlantic rainforest law: environmental regression. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 24, n. 68, p. 147-160, 2010.

VASCONCELLOS, R.L.F. **Bioindicadores de qualidade do solo em um gradiente de restauração ambiental**. 2012. 113 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

VILLEGAS, J.H. **Evaluación del efecto acelerador de microorganismos transformadores de materia orgánica (TMO) en el proceso de compostaje de las deyecciones de bovinos, porcinos y conejos.** 2014. 104 p. Tesis (Maestría en Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente) – Universidad de Manizales, Manizales, 2014.

VONG, P.C.; DEDOURGE, O.; GUCKERT, A. Immobilation and mobilization of labeled sulphur in relation to soil arylsulphatase activity in rizosphere soil of field-grown rape, barley and fallow. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 258, p. 227-239, 2004.

WANG, Y.; QIAN, P.Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. **PLoS ONE**, Hong Kong, v. 4, p. e740, 2009.

WARD, N.L.; CHALLACOMBE, J.F.; JANSSEN, P.H.; HENRISSAT, B.; COUTINHO, P.M.; WU, M.; XIE, G.; HAFT, D.H.; SAIT, M.; BADGER, J.; BARABOTE, R.D.; BRADLEY, B.; BRETTIN, T.S.; BRINKAC, L.M.; BRUCE, D.; CREASY, T.; DAUGHERT, S.C.; DAVIDSEN, T.M.; DEBOY, R.T.; DETTER, C.; DODSON, R.J.; DURKIN, A.S.; GANAPATHY, A.; GWINN-GIGLIO, M.; HAN, C.S.; KHOURI, H.; KISS, H.; KOTHARI, S.P.; MADUPU, R.; NELSON, K.E.; NELSON, W.C.; PAULSEN, I.; PENN, K.; REN, Q.; ROISOVITZ, M.J.; SELENGUT, J.D.; SHRIVASTAVA, S.; SULLIVAN, S.A.; TAPIA, R.; THOMPSON, L.S.; WATKINS, K.L.; YANG, Q.; YU, C.; ZAFAR, N.; ZHOU, L.; KUSKE, C.R. Three genomes from the phylum acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. **Applied Environmental Microbiology**, Los Alamos, v. 75, p. 2046-2056, 2009.

WOESE, C.R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M.L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Acheae, Bacteria and Eukarya. **Proceedings of the National Academy of Science the USA**, Washington, v. 88, p. 4576-4579, 1990.

ZANCHI, F.B.; GOMES, B.M.; VAN RANDOW, C.; KRUIJT, B.; MANZI, A.O. Medições dos fluxos de dióxido de carbono e estimativa do "fetch" (área de influência) em pastagem e floresta em Rondônia. In: CONGRESSO DE ESTUDANTES E BOLSISTAS DO LBA, 1., 2002, Rondônia. **Anais...** Rondônia: LBA, 2002. p. 13.

ZHOU, J.; XIA, B.; TREVES, D.S.; WU, L.Y.; MARSH, T.L.; O'NEILL, R.V.; PALUMBO, A.V.; TIEDJE, J.M. Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. **Applied Environmental Microbiology**, Michigan, v. 68, n. 1, p. 326-334, 2002.

ANEXO



The text in this column is extremely faint and illegible. It appears to be a list or a series of entries, possibly related to a table or a set of data. The text is too light to transcribe accurately.

Anexo

| Reagentes | |
|---|---|
| Solução padrão de p-nitrofenil fosfato (PNP) | 0,840 g de p-nitrofenil fosfato dissódico tetra-hidratado em 50 mL de tampão MUB (pH 6.5-fosfatase ácida; pH 11-alkalina) |
| Tampão MUB | 12,1 g de Tris aminometano; 11,6 g de ácido maléico; 14 g de ácido cítrico e 6,3 g de ácido bórico em 1 L de água destilada destilada |
| Cloreto de Cálcio 0,5 M | 73,5 g de cloreto de cálcio em 1 L de água destilada |
| Hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 M | 20 g de NaOH em 1 L de água destilada |
| Solução padrão de p-nitrofenol | 1 g de p-nitrofenol em 1 L de água destilada |
| Solução de p-nitrofenol sulfato (PNS) | 0,614 g em 50 mL de tampão acetato |
| Tampão acetato 0,5 M, pH 5,8 | 68 g de acetato tri-hidratado em 700 mL de água destilada, adicionar 1,70 mL de ácido acético glacial e completar o volume para 1 L de água destilada |
| Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazol (TCC) | 1 g de TTC em 100 mL de água destilada |
| Trifenil formazan (TPF) | 100 mg de TPF 100 mL de metanol |
| Solução de carboximetil celulose sódico (CMC) | 7 g de CMC em 1 L de tampão acetato. Misturar por 2 h a 45 °C |
| Tampão acetato 2 M | 164,08 g de acetato de sódio em 700 mL de água destilada. Ajustar pH para 5.5 com ácido acético e completar para 1 L de água destilada |
| Solução amido | 20 g de amido em 1 L de tampão acetato |

| | |
|---|---|
| Reagente A | 16 g de carbonato de sódio anidro 0,9 g de cianeto de potássio em 1 L de água destilada |
| Reagente B | 0,5 g de ferricianeto de potássio em 1 L de água destilada |
| Reagente C | 2,7 g de sulfato férrico amoniacal 12 H ₂ O); 1 g de dodecil sulfato de sódio; 4,2 mL de H ₂ SO ₄ em 1 L de água destilada (50 °C) |
| Tampão TRIS 50 mM | 6,1 g de TRIS em 700 mL de água destilada. Ajustar pH para 9.0 com H ₂ SO ₄ e completar para 1 L de água destilada |
| Uréia 200 mM | 1,2 g de uréia em 100 mL de tampão TRIS |
| Cloreto de potássio 2,5 M com sulfato de prata 100 mg/L | 100 mg de sulfato de prata em 700 mL de água destilada. Dissolver 188 g de cloreto de potássio na solução aquecida e completar para 1 L e água destilada |
| Tampão acetato 0,2 M | 16,4 g de acetato de sódio em 1 L de água destilada |
| Fitato de sódio | 0,888 g de fitato em 1 L de água destilada |
| Molibdato de amônia | 25 g de molibdato em 500 mL de água destilada |

14:20 hrs.

Prof. Andre' : 14:50 hrs.

Gráfico da diversidade.

Mudanças climáticas?

| | |
|---|--|
| Resíduo A | 10 g de sulfato amoniac 0.2 g de acetato de potássio em 1 L de água destilada |
| Resíduo B | 1.5 g 100 ferriclorato de potássio em 1 L de água destilada |
| Resíduo C | 2.7 g de sulfato níquel ammoniacal (2 H ₂ O) 1 g de nitratu sulfato de sódio + 2 + L de H ₂ SO ₄ em 1 L de água destilada (50 %) |
| Tampão TRIS 200 mM | 6.1 g de TRIS em 200 ml de água destilada ajustar pH em 8.0 com HClO ₄ e completar para 1 L de água destilada |
| 200 mM NaCl | 1.2 g de NaCl em 100 ml de tampão TRIS |
| Concentração de 100 mM 2.5 M com sulfato de potássio 100 mg/L | 100 mg de sulfato de potássio em 100 ml de água destilada. Dissolver 100 g de cloreto de potássio na solução apoiada e completar para 1 L de água destilada |
| Tampão acetato 0.2 M | 15.4 g de acetato de sódio em 1 L de água destilada |
| Tampão de pH 7 | 0.065 g de H ₂ PO ₄ em 1 L de água destilada |
| Molhos de síntese | 70 g de molhos em 500 ml de água destilada |