

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
(Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

LETICIA PRESTES

DINÂMICA DA ESTRUTURA MICROBIANA EM SOLOS DE CAMPOS NATIVOS
(BIOMA MATA ATLÂNTICA): COMPARAÇÃO METAGENÔMICA ENTRE ÁREAS DE
USO AGRÍCOLA, RESTAURAÇÃO E PRESERVAÇÃO.

PONTA GROSSA

2024

LETICIA PRESTES

DINÂMICA DA ESTRUTURA MICROBIANA EM SOLOS DE CAMPOS NATIVOS
(BIOMA MATA ATLÂNTICA): COMPARAÇÃO METAGENÔMICA ENTRE ÁREAS DE
USO AGRÍCOLA, RESTAURAÇÃO E PRESERVAÇÃO.

Dissertação de Mestrado apresentada ao
programa de Pós-Graduação em Biologia
Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta
Grossa, para obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas (área de concentração de
Caracterização da Biodiversidade).

Orientadora: Prof^a. Dra. Jesiane S. da Silva
Batista

PONTA GROSSA

2024

P936 Prestes, Leticia
Dinâmica da estrutura microbiana em solos de Campos Nativos (Bioma Mata Atlântica): comparação metagenômica entre áreas de uso agrícola, restauração e preservação. / Leticia Prestes. Ponta Grossa, 2024.
69 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Área de Concentração: Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Jesiane Stefânia Batista.

1. Diversidade microbiana. 2. Solo - Histórico - Uso. 3. Restauração. 4. Ecossistema - Campo. 5. Metagenômica. I. Batista, Jesiane Stefânia. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Biologia Evolutiva. III.T.

CDD: 581.7



Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva

Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências Biológicas)



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 03/2024

Ata referente a Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela candidata Leticia Prestes. Aos vinte dias do mês de setembro, sob a presidência da Profa Dra. Jesiane Stefania da Silva Batista, em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da defesa de Dissertação de Mestrado da aluna, **Leticia Prestes** do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Área de concentração em Biologia Evolutiva, constituída pela Dra. Milena Serenato Klepa (membro titular), Dr. Leonardo Araujo Terra (membro titular) e Dr. Luiz Ricardo Olchanheski (membro suplente), atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e à candidata das normas que regem a defesa de Dissertação. A seguir a candidata passou a defesa da sua Dissertação intitulada: "Avaliação do impacto do uso do solo em comunidades microbianas de áreas de Campos Nativos via metagenômica comparativa". Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou a candidata **APROVADA**.

Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim ☒ não ☐

Novo título: Dinâmica da estrutura microbiana em solos de Campos Nativos (Bioma Mata Atlântica): comparação metagenômica entre áreas de uso agrícola, restauração e preservação.

Ponta Grossa, 20 de setembro de 2024.

Banca examinadora:

Documento assinado digitalmente
gov.br LEONARDO ARAUJO TERRA
Data: 20/09/2024 13:34:52-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br MILENA SERENATO KLEPA
Data: 23/09/2024 10:10:31-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br JESIANE STEFANIA DA SILVA BATISTA
Data: 08/10/2024 16:29:34-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e toda minha família que sempre me incentivaram. Em especial a minha mãe Marlene e minha avó Tereza por sempre me apoiarem acreditarem em mim, ao meu Pai Celso e minha irmã Érika.

Ao meu namorado Gregory que esteve ao meu lado me apoiando durante todo desenvolvimento desta pesquisa e nunca me deixou pensar em desistir.

Minha querida orientadora Prof^a Dr^a Jesiane Batista, a quem sinto imensa admiração e gratidão. Um exemplo não só de orientadora, mas também de pessoa. Que sempre está disposta a ajudar e fazer tudo o que está ao seu alcance. Só me cabe agradecer por toda paciência e todos os ensinamentos transmitidos nesta etapa, e pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa.

Agradeço o laboratório de Biodiversidade da Universidade Estadual de Ponta Grossa, e aos meus colegas de laboratório com vocês os dias no laboratório foram muito mais leves e divertidos. Em especial, gostaria de agradecer a minha colega de laboratório Kauane, que está comigo desde a graduação e que pudemos compartilhar juntas os desafios do mestrado.

À banca examinadora por todas as contribuições para esta pesquisa. Em especial ao Dr^o Leonardo Terra e ao Prof^o Dr^o Ricardo Olchanheski, por todo ensinamento e auxílio com a parte de bioinformática. A Embrapa Soja pelo fornecimento do sequenciamento metagenômico.

A Universidade Estadual de Ponta Grossa e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva pela oportunidade de desenvolver este trabalho e por contribuir com minha formação acadêmica.

À Agrocete, Fundação Araucária, CNPQ e ao INCT MicroAgro.

E todos que de alguma forma contribuíram para que essa pesquisa acontecesse.

RESUMO

A expansão das práticas agrícolas tem ocasionado degradação em diversos ecossistemas terrestres, devido à intensificação do uso de solo e conversão de ecossistemas nativos em agroecossistemas. Práticas como estas impactam a estruturação de comunidades microbianas do solo e, consequentemente, nos serviços ecossistêmicos prestados pela microbiota do solo. Os Campos Gerais no Paraná, composto por extensas áreas de vegetação de campos nativos, podem ser considerados frágeis pela exposição a fatores abióticos, exclusão de políticas públicas de conservação e forte pressão da agricultura e silvicultura. As práticas de restauração ecológica são alternativas para recuperação de áreas de Campos Nativos degradados por ações antrópicas. No entanto, o impacto que as mudanças no uso de terra têm sobre as comunidades microbianas desses ecossistemas ainda é pouco compreendido. Com este intuito, o sequenciamento de alto rendimento e a metagenômica comparativa foram utilizados para verificar a composição da comunidade microbiana de caráter taxonômico e funcional em solos de Campos Nativos com diferentes históricos de usos: (1) área agrícola, (2) área de restauração ecológica passiva desde 2017 e (3) área nativa em unidade de preservação. Os resultados mostram que comunidade bacteriana da área agrícola, seguido da área de restauração, apresentaram os maiores valores quanto ao índice de diversidade de Shannon e foram significativamente diferentes da área de preservação. A avaliação da composição taxonômica das áreas revelou que filos considerados copiotróficos como Pseudomonadota foram mais abundantes no ambiente em área de preservação, enquanto filos oligotróficos, como Acidobacteria foram mais abundantes em solo agrícola, ao passo de que a abundância destes filos em área de restauração diminuiu. A comunidade de Archaea não apresentou diferenças quanto aos índices de Shannon e a equitabilidade de Pielou e, portanto, mostraram-se mais resilientes quanto as mudanças de uso de solo. A diversidade fúngica foi maior em área de preservação e foi significativamente distinta da área agrícola, enquanto a área de restauração foi mais semelhante a área de preservação. A análise da diversidade beta calculada pela dissimilaridade de Bray-Curtis indica que a restauração ecológica passiva por um período de cinco anos provocou alterações na comunidade microbiana do solo. Além disso, as áreas agrícola e de restauração apresentaram maior quantidade de genes funcionais diferencialmente abundantes quando comparadas com a de preservação, que pode ser resposta às maiores perturbações nestes ambientes. Em uma análise de componentes principais (PCA) onde PC1 foi responsável por 32,6% da variação foi evidenciado que a diversidade funcional encontrada em área agrícola está mais distante da área de preservação, e a área de restauração encontra-se em posição intermediária, mostrando que a composição funcional também foi afetada pelo histórico de uso do solo. Estes resultados indicam que a comunidade microbiana de solos antropizados de Campos Nativos já apresentam recuperação de sua estrutura em apenas cinco anos de restauração passiva, salientando a importância de práticas de restauração e conservação dos ecossistemas dos Campos Gerais no Paraná.

Palavras-chaves: Diversidade microbiana, Histórico de uso do solo, Restauração, Ecossistema de Campo, Metagenômica.

ABSTRACT

The expansion of agricultural practices has caused degradation in several terrestrial ecosystems, due to the intensification of land use and conversion of native ecosystems into agroecosystems. These practices impact the structuring of soil microbial communities and, consequently, the ecosystem services provided by the soil microbiota. The Campos Gerais in Paraná, composed of extensive areas of native grassland vegetation, can be considered fragile due to exposure to abiotic factors, exclusion from public conservation policies, and intense pressure from agriculture and silviculture. Ecological restoration practices are an alternative for recovering native grassland areas degraded by anthropic actions. However, the impact that land use changes have on the microbial communities of these ecosystems is still poorly understood. For this reason, high throughput sequencing and comparative metagenomics were used to verify this composition of the taxonomic and functional microbial communities in soils from native fields with different use histories: (1) agricultural area, (2) restoration area passive ecological since 2017 and (3) native area in a preservation unit. The results show that the bacterial community of the agricultural area, followed by the restoration area, present the highest Shannon diversity index values that were significantly different from the preservation area. The assessment of the taxonomic composition of the areas revealed that phyla considered copiotrophic, such as Pseudomonadota, were more abundant in the environment in the preservation area, whereas oligotrophic phyla like Acidobacteria were more abundant in the agricultural area, in contrast, the abundance of these phyla in the restoration area decreased. The Archaea community did not show differences in Shannon index and Pielou equitability and, therefore, were more resilient to land use changes. The fungal diversity was higher in the preservation area and was significantly distinct from the agricultural area, while the restoration area was more similar to the preservation area. The beta diversity analysis calculated by the Bray-Curtis dissimilarity indicates that passive ecological restoration for five years has caused changes in the soil microbial community. Furthermore, the agricultural and restoration areas showed a greater amount of differentially abundant functional genes when compared to the preservation area, which may be responses to greater disturbances in these environments. In a principal component analysis (PCA) where PC1 was responsible for 32,6% of the variation, it was evidenced that the functional diversity found in the agricultural area is farther from the preservation area, and the restoration area is in an intermediate position, showing that the functional composition was also affected by the history of land use. These results indicate that the microbial community of anthropized soils of native fields already shows recovery of its structure in just five years of passive restoration, highlighting the importance of restoration and conservation practices of the ecosystems of Campos Gerais in Paraná.

Keywords: Microbial diversity, Land use history, Restoration, Field ecosystem, Metagenomics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação do gene 16s rDNA com regiões conservadas e variáveis (A) e representação do operon ribossomal fúngico, com os domínios variáveis para os genes 18S e o 28S (B).....	14
Figura 2- Localização geográfica dos pontos de coleta. As três áreas de coleta estão localizadas no Estado do Paraná (A e B), todas em ecossistemas de campos naturais (C).....	28
Figura 3- As áreas de estudo localizam-se no Estado do Paraná, região Sul do Brasil (A e B), todas referentes ao ecossistema de Campos Nativos (C).....	34
Figura 4- Curva de rarefação demonstrando a relação entre a riqueza de famílias observadas e o número de amostras para cada tipo de solo.....	37
Figura 5- Abundância relativa das 10 famílias mais abundantes encontradas nos três solos. A dissimilaridade de Bray-Curtis foi calculada e os solos foram agrupados de acordo com suas similares para A) Bactérias, B) Archeae e C) Fungi.....	43
Figura 6- Comparação entre áreas de agricultura, restauração ecológica e preservação baseada na composição de bactérias (A), arqueas (B) e fungos (C) por meio de análise de componentes principais.....	44
Figura 7- Análise de componentes principais (PCA) baseado na composição funcional em solos com diferentes históricos de usos.....	46
Figura 8- Análise de Grupos Ortólogos diferencialmente abundantes A) Preservação vs agrícola; B) Preservação vs Restauração	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Abundância relativa dos táxons classificados com o banco de dados Plus PF-70GB..	36
Tabela 2- Índices de diversidade alfa para Bactérias, Fungos e Archaea.....	38

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO	12
2.1	MICROBIOTA DO SOLO	12
2.2	DIVERSIDADE TAXONÔMICA.....	13
2.3	DIVERSIDADE FUNCIONAL	16
2.3.1	Redundância Funcional	18
2.4	FATORES QUE ESTRUTURAM O MICROBIOMA DO SOLO	19
2.4.1	O Histórico de Uso do Solo e sua Influência na Microbiota do Solo.....	21
3	JUSTIFICATIVA	24
4	OBJETIVOS	26
4.1	OBJETIVO GERAL	26
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
5	MATERIAL E MÉTODOS	27
5.1	CARACTERÍSTICAS DAS ÁREAS DE AMOSTRAGEM E COLETA DE SOLOS	27
5.2	ANÁLISES FÍSICAS, QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DOS SOLOS	28
5.3	EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL	28
5.4	SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (ILLUMINA NEXTSEQ 1000)	29
5.5	PREPARAÇÃO DO MATERIAL METAGENÔMICO	29
5.6	CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS AMOSTRAS.....	29
5.7	ANÁLISES DE DIVERSIDADE	30
5.8	ATRIBUIÇÃO E ANOTAÇÃO DE GENES FUNCIONAIS	30
6	DIVERSIDADE E ESTRUTURA DE COMUNIDADES MICROBIANAS DE SOLOS DE CAMPOS NATIVOS (BIOMA MATA ATLÂNTICA) COM DIFERENTES HISTÓRICOS DE USO	32
6.1	INTRODUÇÃO.....	33

6.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
6.3.1	Diversidade Microbiana dos Solos.....	36
6.3.2	Composição da Comunidade Microbiana.....	39
6.3.3	Estrutura Funcional das Comunidades Microbianas	45
6.3.4	Considerações Finais	48
	REFERÊNCIAS	48
	MATERIAL SUPLEMENTAR	53
7	CONCLUSÃO.....	61
	REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

Solos são ecossistemas muito dinâmicos e populosos. Estima-se que em apenas 1 grama de solo existem cerca de 1 bilhão de células bacterianas e cerca de 200 metros de hifas fúngicas (Xiong; Lu, 2022). Esses números refletem-se em uma complexa miríade de funções biológicas e ecológicas, visto que microrganismos desempenham papéis fundamentais na regulação de ciclos biogeoquímicos de nutrientes essenciais para a vida na Terra (Merloti et al., 2019; Sokol et al., 2022).

Além disso, esses numerosos seres vivos respondem a variações nos seus habitats. Assim, a diversidade microbiana no solo é influenciada por diferentes características físicas, químicas e biológicas do solo, inclusive a cobertura vegetal e o histórico de uso (Guo et al., 2016).

Em cenários atuais, a conversão de habitats naturais para áreas de uso agrícolas é uma das principais causas de perda de espécies em todo o mundo e impactam o microbioma dos solos (Froslev et al., 2022). Reconhece-se a importância de tais áreas na cadeia produtiva, porém devido à sua intensificação e da adoção de práticas nocivas à saúde do solo, os agroecossistemas sofrem um processo de degradação em ritmo dramático (Baude et al., 2019).

Estudos demonstram que o histórico de uso e a cobertura do solo podem influenciar a diversidade microbiana de ecossistemas terrestres. Jangid e colaboradores (2011) identificaram que as comunidades microbianas encontradas em florestas sucessionais com histórico de uso para cultivo demonstraram maior semelhança com florestas decíduas do que com as áreas agrícolas. Isso mostra que, apesar da influência do histórico de uso ser grande, a capacidade de resiliência de comunidades nativas garante o restabelecimento de sua composição original com o tempo. Inclusive, a maioria dos estudos acompanham esse restabelecimento a longo prazo, comparando áreas nativas e agrícolas com áreas que se encontram em processo de restauração ecológica a mais de uma década (Buckley; Schmidt, 2001).

Uma maior diversidade microbiana no solo pode contribuir para estabelecer o equilíbrio funcional em ambientes degradados e potencializa as interações planta-microrganismos, desempenhando papéis fundamentais na restauração ecológica (Singh 2015; Hanif et al., 2019). Atualmente, os avanços nas técnicas de extração de DNA total de amostras ambientais, o sequenciamento de nova geração (NGS) e a aplicação da metagenômica *shotgun*, combinados com ferramentas da bioinformática, possibilitam uma análise mais precisa da diversidade de bactérias,

arqueas e fungos nos solos. Além disso, permitem realizar análises comparativas abrangentes da riqueza, abundância e de genes funcionais dos microrganismos presentes em ecossistemas específicos (Pylro et al., 2013). Dessa forma, é possível investigar de maneira precisa a diversidade de taxa microbianos e sua funcionalidade em variados gradientes ambientais e analisar os impactos das mudanças no uso do solo na diversidade microbiana.

2 REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO

2.1 MICROBIOTA DO SOLO

Os microrganismos constituem grande parte da vida na Terra e a maioria encontra-se associados com outros organismos como animais e plantas. Além disso, desempenham um importante papel em ecossistemas aquáticos e terrestres. Em cada um desses ambientes os microrganismos formam comunidades muito diversificadas e complexas que atuam coletivamente como um microbioma (Wagg et al., 2019).

O solo é um grande reservatório de seres vivos, abrigando uma rica biodiversidade em escala global de diferentes organismos: dezenas de milhares de espécies de bactérias, arqueas, vírus, fungos, protistas e outros eucariotos microscópicos (Sokol et al., 2022). Dentre tais organismos, os fungos e as bactérias são os que apresentam a maior biomassa (Islam et al., 2020; Sokol et al., 2022). De acordo com Xiong e Lu (2022) estima-se que em apenas 1g de solo encontra-se aproximadamente 1 bilhão de células bacterianas, dezenas de milhares de protistas e aproximadamente 200 metros de hifas fúngicas.

Os microrganismos do solo não estão igualmente distribuídos e nem apresentam abundâncias semelhantes. Na ecologia microbiana, os microrganismos formam comunidades onde a estrutura comunitária está relacionada com a densidade e riqueza das populações (Guerra et al, 2021). As comunidades microbianas do solo variam amplamente em diferentes ecossistemas, pois são influenciadas por uma gama de fatores bióticos e abióticos (He et al., 2020).

A microbiota do solo é fundamental para o funcionamento dos ecossistemas terrestres, visto que inúmeras espécies exercem forte influência nos ciclos biogeoquímicos e desempenham papéis cruciais na formação e decomposição da matéria orgânica do solo (Crowther et al., 2019). Portanto, estes microrganismos impactam em diversas funções ecossistêmicas, como na concentração atmosférica de CO₂, o sequestro de carbono, auxiliam na fertilidade do solo e na promoção de crescimento de plantas (Sokol et al., 2022). Adicionalmente, o solo desempenha um papel fundamental no fornecimento de nutrientes para as plantas, e muitos taxa microbianos do solo participam ativamente nesse processo convertendo nutrientes como nitrogênio (N) e fósforo (P), em formas assimiláveis pelas plantas (Nikitin et al., 2022).

De acordo com funções desempenhadas por esses microrganismos nos processos ecossistêmicos, é possível classificá-los em grupos funcionais. Por exemplo, aqueles microrganismos com atividades metabólicas associadas ao ciclo biogeoquímico do N podem ser

classificados em diferentes grupos funcionais. Existem os amonificadores, responsáveis pela produção de amônio (NH_4^+); os diazotróficos realizam a fixação biológica de nitrogênio, que consiste na conversão enzimática do nitrogênio molecular (N_2) em amônia (NH_3), passível de assimilação pelas plantas; os desnitrificadores, que atuam no retorno do N fixado para a atmosfera; dentre outros (Isobe et al., 2020; Nannipieri et al., 2003). É importante salientar que muitos taxa microbianos podem compor um mesmo grupo funcional.

Portanto a microbiota do solo está diretamente relacionada com a manutenção do ecossistema do solo; um ambiente com comunidades microbianas que possuem maior diversidade de espécies também possuirá melhor desempenho para manutenção de tais ecossistemas (Delgado-Baquerizo et al., 2016).

2.2 DIVERSIDADE TAXONÔMICA

Os microrganismos são responsáveis por diversas funções importantes no solo, portanto é de grande relevância conhecer a diversidade microbiana nestes ambientes e atividades funcionais que estão relacionadas à tais comunidades. Técnicas convencionais que dependem de cultivos são frequentemente utilizadas para caracterização da diversidade microbiana do solo. A diluição seriada da amostra de solo seguida do seu plaqueamento permitem o isolamento dos microrganismos que estão presentes em determinado solo (Bald et al., 2021; Zhang; Xu 2008; Kapinusova et al., 2023). A diversidade taxonômica dos microrganismos de uma determinada amostra abrange o número e a abundância relativa dos taxa dentro das comunidades bem como a variabilidade genética dentro dos taxa (Torsvik; Ovreas, 2002).

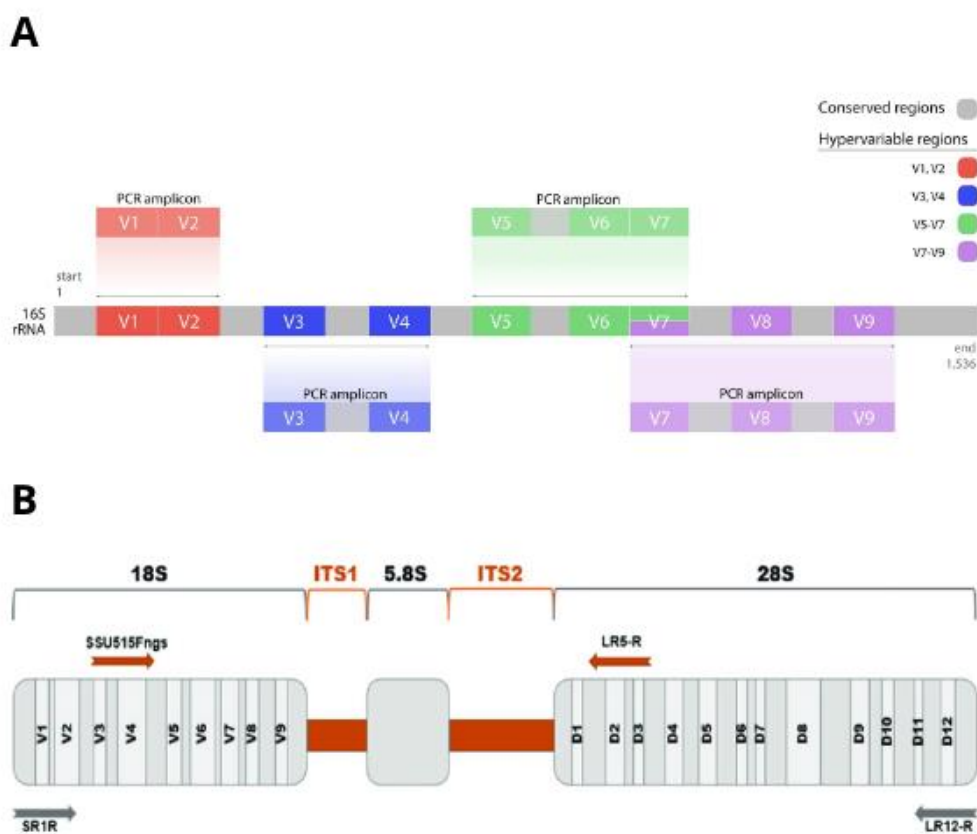
Com os microrganismos cultivados e isolados, é possível realizar a extração de DNA seguido do sequenciamento do mesmo, para a caracterização taxonômica. Existem diversos métodos que podem ser utilizados para caracterizar comunidades microbianas, sendo que a grande maioria utiliza como marcadores os genes ribossomais, como os genes 16S rDNA e 18S rDNA (Zhang; Xu, 2008).

O gene ribossomal 16S rDNA é responsável por codificar o RNA ribossomal 16S, componente da subunidade menor dos ribossomos dos procariotos, enquanto o 18S rDNA desempenha a mesma função em organismos eucariotos (D'Andreano; Cuscó; Francino 2021; López-Aladid et al., 2023). Frequentemente, estes genes são utilizados como marcadores moleculares para identificação taxonômica, sendo considerados os melhores alvos para esta finalidade, assim como para pesquisas

de relações filogenéticas, devido à sua universalidade e à presença de regiões altamente conservadas e variáveis; são as regiões variáveis (Figura 1) que permitem a identificação de diferentes organismos (Amit Roy et al, 2014).

Além disso, para a identificação taxonômica dos fungos as regiões intergênicas (ITS1 e ITS2) são frequentemente utilizadas, tratam-se de duas regiões hipervariáveis e estão indicados na (Figura 1B) e representam os melhores marcadores devido à alta variabilidade entre os níveis taxonômicos fúngicos (D'Andreano, Cuscó e Francino 2021).

Figura 1- Representação do gene 16s rDNA com regiões conservadas e variáveis (A) e representação do operon ribossomal fúngico, com os domínios variáveis para os genes 18S e o 28S (B).



Fontes: (A) López-Aladid et al (2023); (B) D'Andreano, Cuscó e Francino (2021).

Para analisar a composição taxonômica de procariotos em amostras de solo de diferentes áreas na tundra no Alasca, Johnston e colaboradores (2016) utilizaram sequências do gene 16S rDNA recuperadas de sequências geradas por metagenômica *shotgun*. Obiol et al (2020) utilizaram estratégia semelhante para avaliar a diversidade taxonômica de eucariotos microbianos marinhos

(dentre os quais os fungos), selecionando sequências do gene 18S rDNA, levando em consideração suas regiões variáveis para classificação taxonômica. Devido ao uso generalizado destes genes como marcadores moleculares, existe uma grande quantidade de bancos de dados de referência que podem ser utilizados para classificação taxonômica destes microrganismos (Kunin et al., 2008).

Exemplos desses bancos incluem o GenBank (Benson et al., 2018), o RDP (*Ribosomal Database Project*) (Cole et al., 2014) e o SILVA (Quast et al., 2013), que são frequentemente utilizados em estudos de taxonomia microbiana.

Considerando a diversidade de microrganismos, acessar essa diversidade apenas por meio de técnicas dependentes de cultivo não permite inferir com precisão o quão diversa é uma determinada comunidade. Isso se deve à inexistência de meios de cultivo e condições adequadas para isolar a grande maioria dos microrganismos (Kapinusova et al., 2023). Além disso, muitos microrganismos dependem de outros para seu crescimento, dificultando seu cultivo em laboratório. Estima-se que cerca de 97% de toda a microbiota do solo não é cultivável *in vitro* (Foster et al., 2012; Zhang; Xu, 2008). Avanços consideráveis vem sendo alcançados quanto à tal cobertura especialmente devido à adoção de reconstruções metabólicas baseadas em informações genômicas (Kapinusova et al., 2023) mas ainda de forma limitada e pontual.

Os avanços em técnicas de biologia molecular possibilitaram a realização de análises genômicas da maioria dos microrganismos presentes em uma amostra sem a necessidade de cultivo prévio dos mesmos. Isso ampliou o conhecimento sobre a diversidade taxonômica e abundância de microrganismos em amostras ambientais complexas (Fadiji; Babalola, 2020; Quince et al., 2017). Os principais métodos utilizados para estudar comunidades microbianas de amostras complexas são baseados em análises de sequências nucleotídicas de DNA (Hugenholtz; Tyson, 2008; Kunin et al., 2008; Tas et al., 2021).

Abordagens com sequenciamento de alto rendimento permitem análises genômicas dos microrganismos de uma determinada amostra ambiental, inclusive daqueles que não são cultivados em laboratórios (Quince et al., 2017). A metataxonômica, por exemplo, se trata de um sequenciamento de amplicons das regiões hipervariáveis dos genes ribossomais, como o 16S e 18S rDNA, para analisar a diversidade taxonômica de uma amostra ambiental específica (Durazzi et al., 2021).

Outra abordagem é a metagenômica, termo proposto em 1998 para representar genomas totais da microbiota de uma comunidade (Handelsman et al., 1998). A metagenômica baseia-se no

sequenciamento do tipo *shotgun* que, diferente da metataxonômica, não sequencia amplicons mas sim o DNA total de determinada amostra. Anterior ao sequenciamento, o DNA é fragmentado e, por meio de ferramentas robustas de bioinformática, o material é reconstruído *in silico* e classificado utilizando banco de dados de referência (Pérez-losada et al, 2022). O sequenciamento *shotgun* fornece informações tanto sobre a composição taxonômica quanto de genes funcionais da amostra estudada (Quince et al., 2017).

Com a ampla quantidade de material genético obtido pela metagenômica, além de utilizar genes ribossomais como marcadores para classificação microbiana, atualmente alguns *pipelines* baseiam-se em outras abordagens para atribuir a taxonomia dos organismos. Um exemplo é o programa Kraken, frequentemente utilizado em análises de dados metagenômicos complexos que exibem grande quantidade de microrganismos, para as quais as análises computacionais devem ser precisas e completas para caracterização de uma comunidade (Lu et al., 2022).

A classificação do Kraken é baseada em correspondências exatas de *k*-mers que se tratam de subsequências de comprimentos curtos e que são extraídas de genomas de referência. No momento da análise cada *k-mer* que está na amostra é mapeado e relacionado a um táxon, de acordo com correspondências exatas de um banco de dados de sequencias curtas. Abordagens baseadas em *k-mers* são eficazes para analisar um grande volume de dados, devido a sua alta velocidade que é criticamente importante para obtenção dos resultados; combinado a sua precisão, por conta da comparação direta de *k-mers* ao banco de dados (Wood et al., 2019; Wood; Salzberg, 2014).

A metagênomica tem potencial de conferir maior cobertura do que a metataxonômica, até mesmo para o conhecimento da composição taxonômica. Durazzi et al. (2021) com o objetivo de investigar a confiabilidade de ambas as técnicas na identificação bacteriana, compararam a diversidade microbiana intestinal de *Gallus gallus* utilizando abordagens de metataxonômica com a amplificação do gene 16S rRNA e por metagenômica onde o gene ribossomal foi filtrado do sequenciamento *shotgun* por meio de ferramentas da bioinformática. Os resultados da metataxonômica revelaram apenas uma parte da comunidade microbiana, em comparação com a metagenômica, que demonstrou uma maior capacidade em detectar taxa menos abundantes.

2.3 DIVERSIDADE FUNCIONAL

A diversidade funcional pode ser definida como a variedade de funções biológicas e metabólicas atribuídas às comunidades de um dado local, que tem influência no funcionamento de

um ecossistema (Tilman, 2001). Essas funções são aqueles processos que regulam o fluxo de energia e da matéria como a produtividade primária, ciclagem de nutrientes e a decomposição (Laureto et al., 2015). Tendo em vista a influência dos microrganismos no solo e em outros ecossistemas, a diversidade funcional é uma importante medida que avalia o impacto da biodiversidade em processos ecológicos (Díaz et al., 2007).

A diversidade funcional pode ser entendida como a variação de características no espaço funcional ocupado por uma unidade ecológica. Isso se trata de qualquer escala onde verificar a diversidade funcional seja significativo como populações, espécies ou OTUs, comunidades e regiões geográficas (Carmona et al., 2016).

Uma das maneiras de estudar a diversidade funcional dos microrganismos é cultivando-os em laboratório, para verificar as possíveis funções desempenhadas por eles por meio de testes bioquímicos colocando-os em ambientes controlados (Escalas et al., 2019). Como por exemplo muitos estudos realizam o isolamento e a identificação do microrganismo e utilizando métodos bioquímicos específicos caracterizam quanto a capacidade de solubilizar fosfato (Hii et al., 2020; Rasul et al., 2019) fixar nitrogênio (Van Chuong et al., 2024) e produzir ácidos indol-acéticos (AIA) (Kavamura et al., 2013).

Ao considerarmos a diversidade taxonômica de uma comunidade microbiana pode ser detectada utilizando apenas um único gene marcador como o 16s rRNA para as bactérias e arqueias, as regiões ITS e 18S rRNA para os fungos devido a universalidade e conservação do gene (Amit Roy et al., 2014). Entretanto em estudos que analisam os processos biológicos de um determinado ambiente, devido a ampla gama de funções e estratégias ecológicas desempenhadas pelos microrganismos não é possível detectar a diversidade funcional com apenas um único gene (Escalas et al., 2019).

Com o grande aumento de genomas precisos de microrganismos de referência disponíveis, auxiliaram em informações funcionais relacionadas a taxonomia microbiana (Zou et al., 2019). Portanto, uma outra estratégia de estudar a diversidade funcional de uma comunidade microbiana é realizar predições gênicas sobre a capacidade funcional de comunidades microbianas, com base nos perfis de genes de 16S rDNA. Esse processo utiliza resultados de sequenciamento do gene 16S rDNA obtidos por metataxonômica ou reconstruídos por metagenômica para prever a presença de genes funcionais, considerando informações previamente conhecidas e registradas para cada táxon identificado (Toole et al., 2021). As ferramentas *Phylogenetic Investigation os Communities by*

Reconstruction of Unobserved States (PICRUSt2) e Tax4Fun são frequentemente utilizadas para análises de previsões funcionais para grupos bacterianos (Douglas et al., 2020; Wemheuer et al., 2020).

O sequenciamento *shotgun* e a metagenômica fornecem informações mais abrangentes sobre a diversidade de uma comunidade, indo além dos dados taxonômicos. Eles permitem uma análise mais detalhada, incluindo informações sobre os genes funcionais presentes em um determinado ambiente (Quince et al., 2017). Nesses estudos metagênicos que caracteriza a diversidade funcional de uma comunidade bancos de dados específicos como por exemplo o COG (*Clusters of Orthologous Groups*) que permite a classificação de genes em grupos ortólogos, facilitando a identificação de funções biológicas (Galperin et al., 2021). Uma abordagem metagenômica foi utilizada por Zhang et al., (2024) para analisar a função dos microrganismos do solo no metabolismo de carbono e nitrogênio em sete tipos de vegetações, utilizando o COG (Galperin et al., 2021).

Outra ferramenta utilizada é o KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) que auxilia na representação e análise de sistemas biológicos, fornece mapas de vias metabólicas que ilustram funções sistêmicas das células e do organismo, permitindo assim uma abordagem mais detalhada dos processos biológicos em nível molecular (Kanehisa et al., 2024).

2.3.1 Redundância Funcional

Os microrganismos são os principais impulsionadores de inúmeras atividades ecossistêmicas (Fierer et al., 2017). As comunidades microbianas possuem uma notável diversidade taxonômica dentro dos ecossistemas; diversas relações ecológicas permitem a coexistência de espécies microbianas e essa biodiversidade é responsável por determinadas atividades biológicas na manutenção da comunidade (Louca et al., 2018).

Muitos dos microrganismos que ocupam um mesmo nicho ecológico são classificados em diferentes taxa, mas podem possuir genes responsáveis pelas mesmas funções metabólicas (Louca et al., 2018). Em um estudo comparativo da composição taxonômica da microbiota intestinal entre diferentes hospedeiros humanos identificou-se variação na composição taxonômica dos microbiomas entre os hospedeiros, porém o conteúdo de sequências codificadoras de proteínas das diferentes comunidades microbianas foi equivalente (Turnbaugh et al., 2009).

Observações como esta foram feitas ao analisar as comunidades microbianas dentro de tanques de folhagem de bromélias; neste caso foi constatado que a composição funcional das comunidades (por meio da análise de genes relacionados ao metabolismo energético) permaneceu altamente conservada mesmo com diferenças entre os taxa microbianos encontrados nas comunidades estudadas (Louca et al., 2016). Sabendo disso, embora a grande diversidade taxonômica microbiana, grande parte das reações biogeoquímicas são conduzidas por um conjunto limitado de vias metabólicas, sendo encontradas em uma grande variedade de taxa microbianos (Falkowsk et al., 2008).

Essa característica é conhecida como redundância funcional e refere-se às semelhanças funcionais entre as espécies. Aquelas que são consideradas funcionalmente redundantes desempenham papéis similares em um ecossistema, sendo diretamente relacionado à resiliência desses sistemas (Laureto et al., 2015). Os microrganismos do solo, por sua vez, são altamente diversificados, mas funcionalmente redundantes. Isso significa que possuem a capacidade de executar as mesmas funções biológicas, porém cada qual em uma dada condição ambiental, de acordo com o seu repertório genético, sendo um importante fator para a manutenção dos ecossistemas (Wagg et al., 2019).

É improvável que duas espécies sejam completamente redundantes em termos de características múltiplas, porém a redundância funcional parcial entre taxa que executem algumas funções semelhantes é comum. Devido a isso, é possível que comunidades percam algumas espécies sem perder funções ecológicas, ou seja, a inexistência de uma espécie redundante funcionalmente não gera perda das funções dentro da comunidade (Carmona et al., 2016). Manter as funções desempenhadas pelos microrganismos, mesmo com a perda de alguns taxa é importante, pois as vias metabólicas atribuídas a eles direcionam grande parte de ciclos que ocorrem nos ecossistemas, moldando a superfície química da Terra durante milhares de anos (Falkowsk et al., 2008).

2.4 FATORES QUE ESTRUTURAM O MICROBIOMA DO SOLO

Modificações que ocorrem no solo influenciam a diversidade taxonômica e funcional da comunidade microbiana, pois encontram-se relacionadas de maneira direta com um conjunto de fatores abióticos e bióticos (Islam et al., 2020). Diferentes micro-habitats de um mesmo solo que estão separados por pequenos micrometros ou milímetros podem apresentar distintas

características abióticas, abundância, riqueza e taxas das atividades microbianas (Fierer, 2017; Vèdère et al., 2022).

Essa heterogeneidade de fatores dentro de um mesmo solo, bem como entre solos de diferentes origens, possibilita a existência de diferentes habitats que influenciam diretamente na diversidade e na abundância de grupos microbianos (Vos et al., 2013). Isso porque o solo abriga uma ampla quantidade de habitats microbianos, que engloba a rizosfera; as comunidades bacterianas ou de hifas fúngicas encontradas próximas às raízes, podem ser distintas daquelas que estão dispostas no solo total, sugerindo que a localização no solo influencia na composição da diversidade das comunidades do solo (Fierer 2017; Lareen et al. 2016; Philippot et al., 2013).

Propriedades químicas como pH, concentração de carbono orgânico, P e N, textura e salinidade do solo são fortes fatores entre a comunidade microbiana e do funcionamento do solo (Beugnon et al., 2021; Fierer, 2017). Dentre as características abióticas do solo, o pH é um dos fatores que tem maior influência sobre as comunidades microbianas (Fierer, 2017). Em uma pesquisa global sobre comunidades do solo, desenvolvida por Delgado-Baquerizo et al. (2018), foi evidenciado que o pH se trata de um fator chave que molda a diversidade microbiana em diferentes ecossistemas microbianos.

Análises desenvolvidas por Yang et al. (2018) mostraram que o pH impacta a composição da comunidade microbiana do solo e que a abundância de determinados grupos microbianos tem forte relação com a disponibilidade de carbono orgânico nos solos. As alterações do pH do solo induzem modificações nas atividades enzimáticas microbianas, que podem impactar na disponibilidade dos nutrientes.

O clima influencia os microrganismos do solo por meio da temperatura e umidade, ambos interferindo na composição e nas atividades microbianas (Bárcenas-Moreno et al., 2009; Hackl et al., 2005). Porém, um estudo conduzido por Brockett et al. (2012) comparou a estrutura e funções das comunidades microbianas em sete florestas naturais com climas regionais distintos e correlacionou a diversidade com fatores abióticos, concluindo que a umidade é o fator que está mais fortemente correlacionado com a estrutura e atividades microbianas de solos de áreas florestais. Fierer (2017) também aponta a umidade como um dos melhores preditores da biomassa microbiana total do solo: ecossistemas mais úmidos, como os de florestas tropicais, apresentam maiores quantidades de biomassa microbiana permanente.

Yang et al. (2021) verificaram em sua meta-análise que o dióxido de carbono está positivamente relacionado com a diversidade de bactérias e de fungos do solo, aumentando a abundância de grupos microbianos capazes de realizar a fixação de carbono pelo aumento da produção fotossintética. Esses processos podem aumentar a respiração bacteriana do solo e a renovação do carbono orgânico do solo (Kuypers et al., 2018).

Fatores bióticos, como a cobertura vegetal e as interações entre os microrganismos, também interferem na diversidade da microbiota do solo. Hanif et al. (2019) ao analisarem ecossistemas em restauração florestal, concluíram que áreas com maior riqueza e diversidade de espécies de plantas exercem influência positiva na diversidade microbiana do solo. Além disso, Beugnon et al. (2021) observaram que a riqueza de espécies arbóreas aprimorou as propriedades e funções ecossistêmicas desempenhadas pela microbiota no solo.

2.4.1 O Histórico de Uso do Solo e sua Influência na Microbiota do Solo

A expansão da agricultura e silvicultura combinada à elevada parcela de áreas degradadas em decorrência da intensificação do uso de terras para práticas agropecuárias e a conversão de ecossistemas naturais terrestres para áreas com finalidades econômicas está ocorrendo com maior intensidade (Zabel et al., 2019).

A diversidade microbiana do solo é influenciada por vários fatores, sendo a diversidade de plantas um importante impulsionador da microbiota do solo, pois as plantas não apenas fornecem nutrientes aos microrganismos como também liberam exsudatos que contêm metabólitos únicos (Berg; Smalla, 2009). Com a intensificação de práticas agrícolas e silviculturais pode haver a simplificação dos ecossistemas com o cultivo de monoculturas, resultando em redução na variedade de exsudatos liberados pelas plantas, afetando a diversidade microbiana do solo (Venter et al., 2016).

Trentini e colaboradores (2020) avaliaram o efeito da substituição de áreas de Mata Atlântica do norte da Argentina por monocultura de pinheiro-bravo (*Pinus tadea* L.) em relação às propriedades físicas, químicas e microbiológicas do solo e observaram alterações significativas em todas as propriedades avaliadas inclusive na composição de comunidades bacterianas e fúngicas. A abundância relativa de filos que são altamente abundantes, como Proteobacteria e Mortiellomycota, diminuiu em áreas de plantações de pinheiro-bravo, porém aumentou a abundância dos filos Acidobacteria e Basidiomycota.

Uma pesquisa feita por Guo et al. (2016) investigou a conversão de áreas de florestas nativas de folhas largas em florestas mistas e florestas de bambu e mostrou aumento na abundância relativa de bactérias anaeróbias nas florestas de bambu. Isso ocorreu devido à alteração na cobertura vegetal que, por sua vez, afetou propriedades do solo como a concentração de fósforo (P). As bactérias anaeróbias mostraram uma associação negativa com o teor de (P) e, pelo fato de os solos de florestas de bambu apresentarem menor teor de (P), apresentaram um aumento na abundância de bactérias anaeróbias. Portanto, as alterações no uso e na cobertura vegetal resultaram em alterações nas propriedades do solo, que por sua vez, alteraram a composição microbiana e, neste caso, a dinâmica do ciclo do (P).

Em outro estudo que caracterizou comunidades microbianas de solos de um ambiente florestal sem interferências antrópicas em comparação com comunidades de solos agrícola e de pastagem na região do Cerrado, mostrou que a diversidade e a abundância de comunidades bacterianas foram diferentes. Em solos nativos ocorreu elevada abundância de membros do filo Proteobacteria, com dominância dos gêneros *Burkholderia* e *Bradyrhizobium*; em solos de pastagem o filo Firmicutes se destacou, sendo representado quase inteiramente pelo gênero *Bacillus* e em solos com cultivos agrícolas houve o predomínio de Proteobacteria, principalmente dos gêneros *Sphingobium* e *Sphingomonas*, evidenciando que o histórico de uso do solo influencia no perfil da microbiota dos solos (De Souza; Procópio, 2021).

Uma das alternativas para recuperar danos causados pelo uso intensivo de terra é a restauração ecológica dos ambientes agrícolas degradados. Do ponto de vista global, é uma possibilidade de reduzir impactos causados à biodiversidade do solo e a degradação destes ambientes terrestres (Gallie et al., 2017).

As estratégias de restauração ecológica podem ser divididas em duas categorias: a restauração passiva, uma estratégia que utiliza o potencial de regeneração natural removendo os estressores ambientais e a sucessão secundária ocorre de maneira espontânea; e a restauração ativa, onde a recuperação de áreas degradadas é feita via plantio de espécies vegetais para alcançar a estrutura desejada (Morrison; Lindell, 2011). O plantio de espécies nativas em áreas agrícolas degradadas com objetivo de proteção do solo e melhoria da gestão do solo, como a fertilização, são exemplos de restauração ativa (Huang et al., 2019). As práticas de restauração ecológica auxiliam na recuperação da diversidade vegetal no ecossistema degradado e consequentemente afeta a comunidade microbiana do solo (Wang et al., 2020).

Por mais que microrganismos benéficos já estejam naturalmente no solo, o sucesso da restauração ecológica do solo depende de interações entre comunidades de organismos que vivem acima e abaixo do solo, pois são impulsionadores de processos ecossistêmicos. Uma das estratégias que podem ser adotadas na restauração ecológica é aumentar a abundância de microrganismos chave, inclusive por meio da sua introdução ativa (inoculação) (Coban et al., 2022; Hanif et al., 2019).

3 JUSTIFICATIVA

Muito se comenta sobre a importância dos microrganismos na sustentabilidade de ecossistemas terrestres, devido à sua adaptabilidade a diversas condições ambientais, versatilidade metabólica e por influenciar indiretamente a morfologia e fisiologia vegetal (Romdhane et al., 2022). Estudos demonstram que a conversão de áreas florestais para atividades agrícolas resulta na redução da abundância de grupos microbianos associados à ciclagem de nutrientes (Lammel et al., 2015).

A intensificação do uso de terras em todo o mundo, muito frequentemente associado com alterações na vegetação nativa e com o uso intensivo de fertilizantes e pesticidas, podem afetar a diversidade dos microrganismos nos ecossistemas terrestres. Isso porque a vegetação modula a diversidade microbiana do solo, especialmente por meio da liberação de exsudatos radiculares (Romdhane et al., 2022).

Em ecossistemas naturais existe uma grande diversidade de plantas que são os principais reguladores das comunidades microbianas do solo, contribuindo para a biomassa da serapilheira e para a diversidade de exsudatos radiculares liberados pelas plantas (Broeckling et al., 2008; Urbanová et al., 2015). A substituição desses ambientes por monoculturas acarreta mudanças substanciais resultando em uma serapilheira mais homogênea e redução da diversidade dos exsudatos radiculares, ocasionando alterações nas características físicas, químicas e biológicas do solo (Urbanová et al., 2015).

A região dos Campos Gerais no Paraná é caracterizada por possuir extensas áreas com vegetação de campo nativo e zonas de transição entre os biomas Mata Atlântica e Cerrado, ambos considerados *hotspots* da biodiversidade (Ritter et al., 2010). Os campos nativos são ecossistemas abertos, compostos por uma vegetação herbácea e subarbustiva; nesse ecossistema, diversos fatores abióticos peculiares são usualmente relatados, como a baixa profundidade do solo, baixa capacidade de retenção de água, alta taxa de evaporação, insolação intensa e ventos frequentes (Moro; Carmo, 2007).

Apesar de oferecerem diversos serviços ecossistêmicos, os campos são usualmente negligenciados em programas de conservação da biodiversidade e grande parte das políticas públicas não atendem esses ecossistemas, resultando em altas taxas de conversão de tais ecossistemas em lavouras e silvicultura (Overbeck et al., 2022). Em recente carta publicada pela revista Science, Overbeck e colaboradores (2024) salientam os riscos da aprovação do projeto de

lei no. 364 de 2019, que promove possibilidade de supressão de vegetação nativa não-florestal em todo o território nacional.

Devido a estes impactos, a restauração ecológica é uma alternativa para recuperar campos que foram degradados por atividades antrópicas. Conhecer a dinâmica das comunidades microbianas de solos neste ecossistema pouco estudado, em áreas com diferentes histórico de usos, é importante para auxiliar no delineamento de estratégias de restauração ecológica mais eficientes, enfatizar seus serviços ecossistêmicos e reconhecer sua importância para políticas de conservação.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o impacto do histórico de uso do solo na diversidade taxonômica e funcional de comunidades microbianas de solos de Campos Nativos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar solos de áreas de Campos Nativos com diferentes histórico de usos;
- Submeter os solos a análises físicas, químicas e biológicas;
- Realizar a extração total do DNA total das amostras de solo e o sequenciamento de alto rendimento do material genético extraído;
- Verificar e comparar a diversidade taxonômica de bactérias, arqueas e fungos em três solos que tiveram diferentes histórico de usos;
- Verificar e comparar o perfil funcional encontrado nos três solos que tiveram diferentes históricos de usos;
- Relacionar a diversidade microbiana de solos com diferentes históricos de usos com os aspectos físicos, químicos e bioindicadores;
- Analisar se o histórico de uso do solo e sua cobertura vegetal influenciam na diversidade e abundância de taxa microbianos e nas suas respectivas atividades funcionais.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DAS ÁREAS DE AMOSTRAGEM E COLETA DE SOLOS

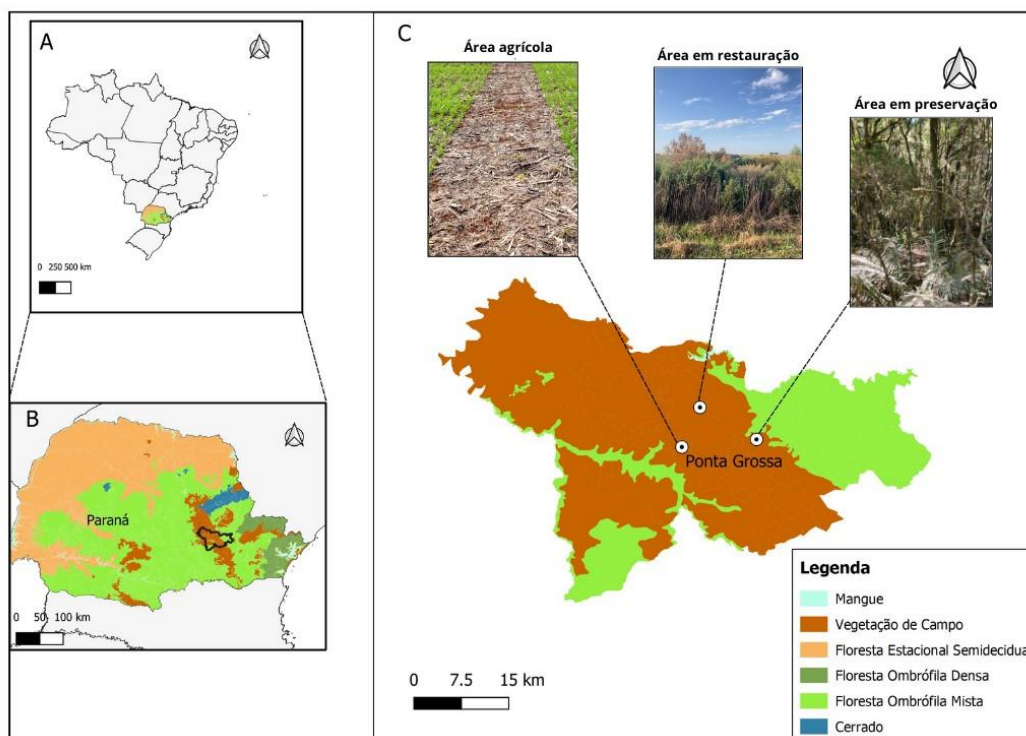
Foram coletados solos em três regiões inseridas no Bioma Mata Atlântica, de fitofisionomia campestre (Campos Nativos) com diferentes históricos de usos, localizadas nos Campos Gerais no Paraná, município de Ponta Grossa (Figura 2). A região tem predomínio de Cambissolo e Latossolo Vermelho distrófico (Embrapa, 2018) e, segundo a classificação climática de Köppen-Geiger, apresenta clima do tipo Cfa (subtropical úmido quente), com influência indireta do clima Cfb (temperado sempre úmido). As coletas dos solos foram realizadas em 2022, no mês de agosto, que é considerado o mês mais seco na região, com precipitação média entre 50 e 90 mm (INPE, 2023). Cada amostra foi constituída por 15 subamostras de solo, coletadas a uma profundidade de 0-20 cm em sistema de “zigue-zague”, por uma área de cerca de 1 ha. As subamostras foram peneiradas e homogeneizadas em betoneira para compor cada amostra composta.

A primeira área se trata da Fazenda Modelo da Embrapa em Ponta Grossa, PR (25.15820°S, 50.07272°W), estabelecida em 1912, utilizada para experimentação agrícola e aclimação de culturas. A área selecionada tem longo histórico de rotação milho/feijão/aveia/soja/aveia/soja/milho e sem histórico de uso de inoculantes biológicos.

A segunda corresponde a uma área de restauração ecológica, pertencente à Fazenda Escola Campão da Onça da Universidade Estadual de Ponta Grossa (25.09576°S, 50.04426°W). A área foi ocupada por cultivos agrícolas por cerca de 20 anos, em sistema de plantio direto na palha, em sistema de rotação (principalmente com soja, milho, trigo e aveia) e sem histórico de uso de inoculantes biológicos. A área passa por restauração ecológica passiva desde 2017.

A terceira área encontra-se em zona de transição Campos Naturais-Floresta Ombrófila Mista aluvial (25.14615°S, 49.95519°W) (autorização MMA/IMCBio/Sisbio 81846-1) localizada nas dependências do Parque Nacional dos Campos Gerais, uma das importantes Unidades de Conservação da região dos Campos Gerais, inserido na Área de Preservação Ambiental (APA) da Escarpa Devoniana.

Figura 2- Localização geográfica dos pontos de coleta. As três áreas de coleta estão localizadas no Estado do Paraná (A e B), todas em ecossistemas de campos naturais (C).



Fonte: A autora.

5.2 ANÁLISES FÍSICAS, QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DOS SOLOS

Alíquotas compostas de 500g dos solos foram encaminhadas para determinação das propriedades físicas, químicas e biológicas pelo laboratório Laborsolo em Londrina-Paraná. A bioanálise foi feita por meio da determinação da atividade das enzimas arilsulfatase e β -glicosidase, seguindo a tecnologia de bioanálise de solo (bioAS) da Embrapa. As propriedades químicas do solo como a determinação de enxofre, fosfato de cálcio, fósforo mehlich 1 e fósforo remanescente foram feitos por espectrofotometria. O pH do solo foi determinado por potenciometria e a técnica ICP-OES foi utilizada para determinação de P-Mehlich 3.

5.3 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL

Cada amostra de solo foi submetida a extração de DNA total utilizando o kit DNeasy PowerSoil Pro (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. A extração ocorreu a partir de 400mg de solo que foi adicionado em um tubo com esferas de batimentos, permitindo que as células sejam lisadas de forma mecânica. A quantificação e a qualidade do material genético extraído em

cada uma das amostras foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1% e através da absorbância em 260 e 280 nm em espectrofotômetro NanoVue Plus (Cytiva, EUA) e em NanoDrop 200 (Thermo Fisher Scientific, EUA).

5.4 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (ILLUMINA NEXTSEQ 1000)

As bibliotecas foram preparadas utilizando o kit de preparação de biblioteca de DNA Nextera XT (Illumina, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Primeiro, o DNA metagenômico foi fragmentado e marcado utilizando o processo de fragmentação. Em seguida, o DNA marcado foi amplificado usando o programa de PCR de ciclo limitado para adicionar adaptadores (*index*).

Além disso, as bibliotecas foram purificadas com esferas Agencourt® AMPure XP 0,6x (Beckman Coulter, EUA). Finalmente, as bibliotecas foram quantificadas usando o fluorômetro Qubit Invitrogen da Thermo Fischer Scientific e sequenciadas em pares (*paired end*) (2x 150 pb) com a plataforma Illumina NexSeq 1000. O sequenciamento foi feito na Embrapa Soja em Londrina-PR, Brasil.

5.5 PREPARAÇÃO DO MATERIAL METAGENÔMICO

As amostras foram processadas de acordo com as seguintes etapas: 1) remoção de duplicatas e; 2) remoção dos cinco primeiros e últimos nucleotídeos (nt) de cada leitura. Na segunda etapa, leituras com comprimentos totais ≤ 20 nt foram removidas de ambos os lados e aquelas leituras com o índice de qualidade de Phred ≤ 20 . Finalmente, sequências com baixa complexidade, duplicatas exatas e leituras contínuas com mais de 5 N para cada leitura foram filtradas. Todas as etapas foram executadas utilizando o programa fastp (Chen et al., 2018).

5.6 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS AMOSTRAS

Os dados pré-processados foram submetidos a atribuição taxonômica utilizando o programa Kraken2, que analisa as correspondências exatas de *k*-mers utilizando um banco de dados de referência, mapeando o ancestral comum mais baixo (LCA) dos genomas que contêm estes *k*-mers, para a atribuição taxonômica (Wood; Salzberg, 2014). Para isso, foi utilizado como referência os bancos de dados PlusPF 70 GB (*Standard plus, Protozoa, Fungi*) disponível em <https://benlangmead.github.io/aws-indexes/k2>. Para a visualização dos resultados obtidos pelo

programa Kraken2 foi utilizado o pacote Pavian (Breitweiser; Salzberg 2019) software R (R Core Team 2023), versão 4.3.2.

5.7 ANÁLISES DE DIVERSIDADE

Com os resultados das atribuições taxonômicas geradas pelo programa Kraken2 foram feitas as análises de diversidade alfa onde foi calculada a riqueza de espécies, índices de diversidade de Shannon-Wiener (H') e Simpson, e a equitabilidade de Pielou (J) para verificar a distribuição dos taxa nas amostras. Para entender as relações entre as comunidades dos solos de diferentes históricos de usos, a diversidade beta foi calculada por meio da dissimilaridade de Bray-Curtis. Além disso, foi realizada uma análise de componentes principais (PCA) levando em consideração a riqueza de famílias de cada organismo analisado.

Todas as análises foram feitas utilizando o pacote Vegan (Oksanen, 2024) e ggplot2 (Wickham et al., 2016) no programa R. Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e o teste de comparação de médias utilizando o pacote agricolae (Mendiburu, 2023), também no programa R (R Core Team 2023), versão 4.3.2.

5.8 ATRIBUIÇÃO E ANOTAÇÃO DE GENES FUNCIONAIS

Com as leituras processadas a montagem das sequências consenso (*contigs*) foi executada usando o programa metaSPAdes (Nurk et al., 2017). Nesta etapa foi feita a concatenação de todas as sequências (R1 e R2) que correspondiam às repetições de uma mesma amostra, para obter *contigs* maiores. Na sequência, *contigs* menores que 300 pares de bases foram removidos.

Nesta análise foram feitas as seguintes comparações: 1) área de preservação (controle) vs área agrícola (tratamento); e 2) área de preservação (controle) vs área de restauração (tratamento). Para cada comparação foi necessário utilizar um genoma de referência para verificar as abundâncias gênicas entre as amostras, onde as montagens individuais da área de preservação e da área agrícola foram concatenadas, para realizar a primeira comparação. Para a segunda comparação foram concatenadas as sequências da área de preservação com a área de restauração. Depois de concatenadas, foram indexadas utilizando o programa bowtie2 (Langmead et al., 2019). A anotação gênica foi feita utilizando o programa Prokka (Seemann, 2014).

O pacote de Deseq2 (Love et al., 2014) do programa R foi utilizado para a realizar a contagem de genes diferencialmente abundantes nas amostras comparadas. Com isso foi gerado um arquivo multifasta que foi submetido no banco de dados eggNOG (Huerta-Cepas et al., 2019). Para identificação de genes ortólogos foi utilizado o banco de dados de clusters de genes ortólogos (COGs) (Galperin et al., 2021).

Além disso para uma análise geral de genes funcionais presentes nas amostras, um alinhamento contra o banco de dados de COGs foi feita utilizando o programa Diamond (Buchfink et al., 2021). A análise de componentes principais (PCA) foi realizada utilizando os resultados da diversidade funcional obtidos pelo COG por meio dos pacotes vegan (Oksanen, 2024) e ggplot2 (Wickham et al., 2016) do software R (R Core Team 2023), versão 4.3.2.

6 DIVERSIDADE E ESTRUTURA DE COMUNIDADES MICROBIANAS DE SOLOS DE CAMPOS NATIVOS (BIOMA MATA ATLÂNTICA) COM DIFERENTES HISTÓRICOS DE USO

Resumo

A conversão de ecossistemas naturais tem ocorrido com maior frequência e é responsável por ocasionar diversos efeitos que podem alterar a estrutura de comunidades microbianas do solo. Ecossistemas abertos, como os campos nativos, são ainda mais expostos às pressões para expansão de monoculturas e pouco se sabe sobre o impacto da restauração ecológica desses ecossistemas. Neste trabalho, a diversidade microbiana de áreas dos Campos Gerais (Paraná, Brasil) com diferentes históricos de uso (área agrícola, restauração passiva e área nativa em preservação) foi analisada por metagenômica. Os índices de diversidade de Shannon mostraram diferenças significativas para as comunidades bacterianas e fúngicas dos solos. Foram encontradas maiores abundâncias do filo Acidobacteria, caracterizado como oligotrófico, em área agrícola, enquanto na área de restauração a abundância reduziu e ficou mais semelhante ao que foi encontrado em solos de vegetação nativa. O índice de diversidade de Shannon e a equitabilidade de Pielou para a comunidade fúngica foram significativamente distintos entre os solos, neste caso sendo mais semelhantes entre as áreas de preservação e restauração. Além disso, a análise de componentes principais mostrou que a diversidade funcional é diferente nos três solos, onde a área em restauração está em uma posição intermediária, e composição funcional das áreas agrícola e em preservação estão mais distantes. Os resultados indicam que a composição das comunidades microbianas da área de restauração ecológica encontra-se em condição intermediária entre as demais áreas cinco anos após estabelecimento de processo passivo.

Palavras-chave: Diversidade microbiana, Impacto de uso do solo, Restauração Ecológica, Vegetação de Campo

6.1 INTRODUÇÃO

Atualmente a conversão global e continua de ecossistemas naturais em decorrência da intensificação de práticas agrícolas tem resultado em áreas altamente degradadas (Orgiazzi et al., 2016; Zabel et al., 2019). Estudos anteriores revelam que o histórico de uso e as conversões de habitats modificam o solo, no que diz respeito as suas propriedades físicas, químicas e biológicas podendo impactar consideravelmente na estrutura das comunidades microbianas que habitam o solo (Sun et al., 2020; Li et al., 2020; Melo et al., 2021) consequentemente afetando as funções desempenhadas pela microbiota do solo (Meena; Rao, 2021).

Apesar de oferecerem diversos serviços ecossistêmicos, os ecossistemas abertos, como os campos e savanas, são usualmente negligenciados em programas de conservação da biodiversidade, resultando em altas taxas de conversão de tais ecossistemas em lavouras e silvicultura (Overbeck et al., 2022; Buisson et al., 2018; Parr et al., 2014). Em contraste, são ambientes vulneráveis às perturbações antrópicas, principalmente por atividades que modificam o solo (Miola et al., 2021). Os Campos Gerais no Paraná (Bioma Mata Atlântica, região Sul do Brasil) apresenta extensas áreas de vegetação de campos nativos, riqueza de espécies endêmicas, com zonas de transição entre os biomas Mata Atlântica e Cerrado ambos considerados *hotspots* da biodiversidade (Paulistch et al., 2019; Ritter et al., 2010).

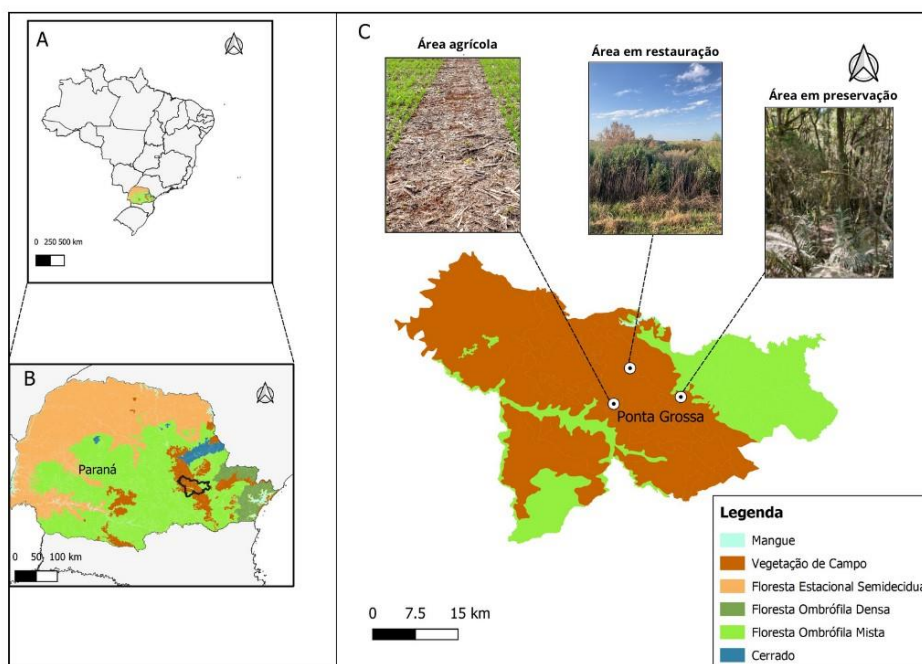
O presente estudo utilizou o sequenciamento de alto rendimento e a metagenômica comparativa para avaliar a diversidade taxonômica e funcional de três solos de áreas de Campos Nativos dos Campos Gerais do Paraná com distintos históricos de uso sendo: (1) uma unidade de preservação que pertence ao Parque Nacional dos Campos Gerais; (2) uma área com um longo histórico de uso agrícola e; (3) uma área de restauração ecológica passiva.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados solos em três regiões inseridas no Bioma Mata Atlântica, de fitofisionomia campestre (Campos Nativos) com diferentes históricos de usos, localizadas nos Campos Gerais no Paraná, município de Ponta Grossa (Figura 3). A região tem predomínio de Cambissolo e Latossolo Vermelho distrófico (Embrapa, 2018) e, segundo a classificação climática de Köppen-Geiger, apresenta clima do tipo Cfa (subtropical úmido quente), com influência indireta do clima Cfb (temperado sempre úmido). A área 1 foi estabelecida em 1912, utilizada para experimentação

agrícola e aclimação de culturas, com longo histórico de rotação (principalmente com soja, milho, trigo e aveia). A área 2 corresponde a uma área que foi ocupada por cultivos agrícolas desde os anos 90, em sistema de rotação (em sistema similar à área 1), seguida por restauração ecológica passiva desde 2017. A área 3 encontra-se em zona de transição Campos Naturais-Floresta Ombrófila Mista aluvial (autorização para coleta MMA/IMCBio/Sisbio 81846-1) localizada nas dependências do Parque Nacional dos Campos Gerais, inserido na Área de Preservação Ambiental (APA) da Escarpa Devoniana. As coletas dos solos foram realizadas em agosto de 2022, com precipitação média entre 50 e 90 mm (INPE, 2023). Cada amostra foi constituída por 15 subamostras de solo, coletadas a uma profundidade de 0-20 cm em sistema de “zigue-zague”, por uma área de cerca de 1 ha. As subamostras foram peneiradas e homogeneizadas em betoneira para compor cada amostra composta.

Figura 3- As áreas de estudo localizam-se no Estado do Paraná, região Sul do Brasil (A e B), todas referentes ao ecossistema de Campos Nativos (C). A área 1 (25.15820°S, 50.07272°W) é uma área de agricultura, a área 2 (25.09576°S, 50.04426°W) representa área de restauração ecológica passiva de prévio uso agrícola e a área 3 (25.14615°S, 49.95519°W) possui vegetação nativa e encontra-se inserida em área de proteção permanente.



Fonte: A autora.

O DNA total de cada amostra foi extraído (DNeasy PowerSoil Pro, Qiagen), quantificado e avaliado quanto à qualidade por eletroforese em gel de agarose 1% e por absorbância em 260 e 280 nm (NanoVue Plus, Cytiva, EUA e NanoDrop 200, Thermo Fisher Scientific, EUA). As bibliotecas

metagenômicas foram preparadas (DNA Nextera XT, Illumina, EUA) e purificadas (Agencourt® AMPure XP 0,6x, Beckman Coulter, EUA). O sequenciamento ocorreu aos pares (*paired-end*) através da plataforma Illumina NextSeq 1000, gerando leituras com aproximadamente 150 pares de base (pb). Os cinco primeiros e últimos nucleotídeos (nt) de cada leitura, duplicatas exatas e leituras < 20 nt e/ou com qualidade Phred < 20 foram removidos utilizando o programa fastp (Chen et al., 2018).

Para a atribuição taxonômica foi utilizado o programa Kraken2 (Wood; Salzberg, 2014) com o banco de dados PlusPF 70 GB. Os resultados foram visualizados com o pacote Pavian (Breitweiser; Salzberg 2019). As análises de diversidade alfa, a riqueza de espécies, índices de diversidade de Shannon-Wiener (H') e Simpson, a equitabilidade de Pielou (J) e a diversidade beta foi calculada por meio da dissimilaridade de Bray-Curtis foram calculados com o pacote Vegan (Oksanen, 2024).

Para uma análise geral de genes funcionais um alinhamento contra o banco de dados de Clusters de genes ortólogos (COGs) foi feita utilizando o programa Diamond (Buchfink et al., 2021). Uma análise de componentes principais (PCA) foi realizada utilizando os pacotes vegan (Oksanen, 2024) e ggplot2 (Wickham, 2016) do software R (R Core Team 2023), versão 4.3.2.

Para a identificação de genes diferencialmente abundantes nas amostras foi utilizado o pacote DESeq2 (Love et al., 2014) do software R (R Core Team 2023), versão 4.3.2. Para isso, após o processamento das leituras, a montagem das sequências consenso (*contigs*) foi executada usando o programa metaSPAdes (Nurk et al., 2017). Para obter *contigs* maiores foi necessário realizar a concatenação de todas as sequências (R1 e R2) que correspondiam às repetições de uma mesma amostra.

Nesta etapa foram feitas duas comparações: 1) área de preservação (controle) vs área agrícola (tratamento); e 2) área de preservação (controle) vs área de restauração (tratamento). Para cada comparação foi necessário utilizar um genoma de referência para verificar as abundâncias gênicas entre as amostras, onde as montagens individuais da área de preservação e da área agrícola foram concatenadas, para realizar a primeira comparação. Para a segunda comparação foram concatenadas as sequências da área de preservação com a área de restauração.

Depois de concatenadas, foram indexadas utilizando o programa bowtie2 (Langmead et al., 2019). E em seguida a anotação gênica foi feita utilizando o programa Prokka (Seemann, 2014). Com os resultados obtidos através do programa DESeq2 (Love et al., 2014) um arquivo multifasta

contendo os genes diferenciais de cada comparação foi gerado e submetido ao banco de dados eggNOG (Huerta-Cepas et al., 2019). Em seguida, o banco de dados de Clusters de genes ortólogos (COGs) (Galperin et al., 2021) foi utilizado para verificar as categorias diferencialmente abundantes.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sequenciamento metagenômico resultou em aproximadamente 27 milhões de leituras considerando todas as amostras, sendo que em torno de 9.4 milhões correspondem ao solo agrícola, 9.3 milhões ao solo de restauração e 9.9 milhões a área de preservação nativa. Após a análise de qualidade das sequências, cerca de 2% das leituras foram removidas de cada amostra.

6.3.1 Diversidade Microbiana dos Solos

As leituras foram submetidas ao programa Kraken2 para atribuição taxonômica, onde o banco Plus PF-70GB que possui cobertura para procariotos, protozoários e fungos foi utilizado. A porcentagem de *reads* que foram classificadas encontra-se na Tabela suplementar 3.

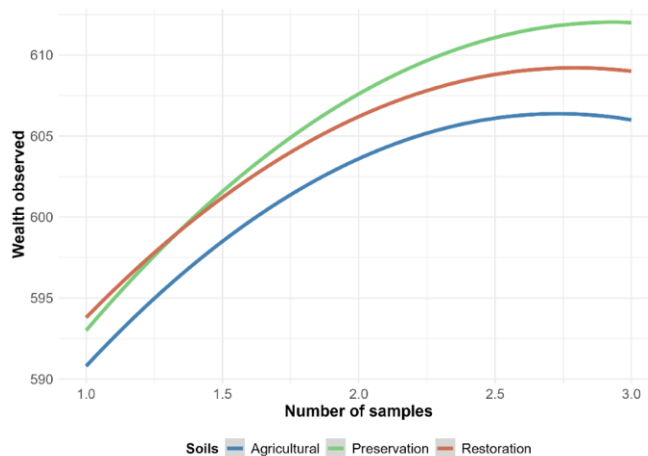
A classificação taxonômica resultou na identificação de 69 filos, 141 classes, 288 ordens, 631 famílias e 2231 gêneros (Tabela 1). Em termos de abundância relativa, as bactérias foram as mais representativas para todos os taxa encontrados enquanto dentre os fungos as abundâncias foram menores, inclusive por se tratar de um único reino do domínio Eukarya (Tabela 1). Também está relacionado com o fato que os membros do domínio Bacteria são mais representados em bancos de dados altamente curados, enquanto os bancos de dados referentes aos fungos ainda são limitados (Vieira et al., 2021).

Tabela 1- Abundância relativa dos taxa classificados com o banco de dados Plus PF-70GB.

Organismos	Filos	Classes	Ordens	Famílias	Gêneros
Domínio Archaea	11.594203	12.056738	10.069444	7.131537	6.544151
Domínio Bacteria	71.014493	73.758865	79.861111	85.26149	90.138951
Reino Fungi	4.347826	7.801418	5.902778	5.071315	2.420439
Outros	13.043478	6.382979	4.166667	2.535658	0.896459

A curva de rarefação representada na Figura 4, verifica como a riqueza de microrganismos varia de acordo com o tamanho amostral em cada solo. Foi possível identificar que as curvas dos três tipos de solo estavam estabilizadas, sugerindo boa representatividade dos organismos.

Figura 4- Curva de rarefação demonstrando a relação entre a riqueza de famílias observadas e o número de amostras para cada tipo de solo.



Para avaliar se há diferença entre a diversidade microbiana dos solos, os índices de diversidade alfa foram calculados. Não foi observada diferença para o domínio Archaea quanto ao índice de diversidade de Shannon e a equitabilidade de Pielou; já o índice de Simpson apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) para o grupo. Para os índices de diversidade de Shannon, Simpson e a equitabilidade de Pielou, as comunidades de bactérias e os fungos demonstraram diferenças significativas entre os solos ($p < 0,05$). No entanto, o teste de comparação de médias de Tukey com significância de $p < 0,05$ foi feito para verificar os solos que apresentam diferenças significativas e os resultados estão listados na Tabela 2.

Estes resultados indicam que para as bactérias, o índice de diversidade de Shannon em área agrícolas e de restauração são semelhantes entre si e se diferenciam da diversidade encontrada em área de preservação. O índice de diversidade de Simpson, que auxilia na avaliação da dominância de espécies, foi diferente nos três solos ($p < 0,05$), indicando que a uniformidade dos organismos nos solos é diferente (Finn, 2024); na área agrícola há dominância de determinados organismos em relação às outras áreas. Além disso, o índice de equitabilidade de Pielou, foi menor na área de preservação ($p < 0,05$), indicando menor uniformidade da distribuição de indivíduos dentre as espécies existentes.

Tais resultados indicam que a diversidade microbiana da área de restauração estatisticamente está mais próxima a área agrícola (que apresentou maior diversidade), porém ocupa um estágio intermediário entre área de preservação e agrícola cinco anos após processo de restauração ecológica passiva. Resultados como estes também foram encontrados por Pedrinho et al. (2018)

quando avaliaram os efeitos da conversão e recuperação de áreas de floresta amazônica em pastagens nas comunidades microbianas do solo. Além disso os autores sugerem que a maior diversidade microbiana em solos com maior atividade antrópica pode ser explicada pelas condições estressantes que estes ecossistemas enfrentam, podendo ter resultado no aumento da diversidade taxonômica nesses ambientes.

Tabela 2- Índices de diversidade alfa para Bactérias, Fungos e Archaea das áreas de Campos Nativos com uso agrícola, de restauração e de preservação. Letras minúsculas representam diferenças estatísticas entre diferentes solos ($p < 0.05$).

Área	Shannon (H)	Pielou (J')	Simpson (D)
Bactérias			
Agrícola	4,10 a	0,655 a	0.962171 a
Restauração	4,07 a	0,650 a	0.956846 b
Preservação	3,98 b	0,636 b	0.945805 c
Fungos			
Agrícola	2,78 b	0,811 b	0.90378 b
Restauração	2,90 ab	0,854 ab	0.926637 a
Preservação	2,98 a	0,871 a	0.935453 a
Archaea			
Agrícola	2,15 a	0,603 a	0.842709 a
Restauração	2,13 a	0,604 a	0.83133 ab
Preservação	2,09 a	0,581 a	0.82622 b

Em relação aos fungos, as áreas de preservação e restauração apresentaram índices de Shannon, superiores à agrícola. A uniformidade da distribuição dos indivíduos (índice J') dos fungos foi superior aos demais grupos microbianos avaliados. Isso também foi observado por Dong et al. (2021) quando avaliou a estrutura das comunidades em diferentes gradientes de degradação. A diversidade fúngica em área não-degradada é maior e diminui conforme a intensidade de degradação, sugerindo que os fungos são mais sensíveis à degradação do solo devido a quantidade limitada de nutrientes em solos com atividades agrícolas intensas.

A diversidade de fungos aumenta de acordo com a complexidade do solo, provavelmente devido ao fato de que os fungos possuem importantes papéis na degradação de materiais vegetais recalcitrantes. Ecossistemas naturais são mais complexos e, portanto, produzem maiores quantidades e variedade de detritos vegetais, aumentando a quantidade de substratos e assim, favorecendo a diversidade fúngica (Van Der Heyde et al., 2020).

6.3.2 Composição da Comunidade Microbiana

A dissimilaridade de Bray-Curtis foi utilizada para verificar a similaridade entre os solos analisados, levando em consideração as abundâncias das famílias mais abundantes de cada grupo. Os resultados evidenciam que a restauração ecológica passiva, após cinco anos, já se reflete em alteração da comunidade microbiana (Figura 5). Com relação à comunidade bacteriana, foi identificado que a área agrícola X restauração foram as mais similares (0.05119616), a área agrícola X preservação apresentaram menor similaridade (0.14720407) e a área de preservação X restauração demonstraram similaridade intermediária (0.09980831). Observou-se o mesmo para os fungos, onde a área agrícola X preservação mostram-se mais distantes (0.2016647) enquanto área agrícola X restauração apresentaram a maior semelhança (0.1232621). Para as arqueas, a área de restauração apresentou maior semelhança com a área de preservação.

De forma geral os filos bacterianos com maior predominância foram Pseudomonadota e Actinomycetota nos três solos. Ambos estão entre os filos bacterianos mais abundantes em solos em todo mundo (Delgado-Baquerizo et al., 2018). Nas amostras da área agrícola, Pseudomonadota, anteriormente conhecido como Proteobacteria, apresentou uma abundância relativa de aproximadamente 45,46% e Actinomycetota de 44,6%. Na área de restauração a abundância relativa de Pseudomonadota foi 47% e Actinomycetota de 43%.

Em solos de área de preservação a abundância relativa o filo Pseudomonadota foi mais expressiva (55,41%) do que nos outros solos, por outro lado Actinomycetota apresentou abundância relativa menor (35,72%). Isso pode estar relacionado com o fato de que o filo Pseudomonadota é ecologicamente diverso e abriga grande quantidade de organismos copiotróficos, ou seja, vivem preferencialmente em solos ricos em nutrientes, principalmente naqueles com maior concentração de carbono (Guo et al., 2018).

Por outro lado, ao analisar as abundâncias de demais filos encontrados em cada solo é possível notar que os filos Acidobacteria, Gematimonadetes e Bacillota (anteriormente conhecido como Firmicutes), estão presentes em todas as amostras. Porém, estão em maior abundância em solos de área agrícola, e diminuem a abundância em áreas de restauração e de preservação, onde foram obtidas as menores abundâncias. Estes filos são considerados oligotróficos e tendem a ter maiores abundâncias em ambientes perturbados e limitados de nutrientes (Guo et al., 2018; Yang et al., 2022). Estas semelhanças entre as áreas de restauração e preservação podem estar

relacionadas com o fato de que a abundância de grupos oligotróficos diminuem com o tempo de restauração (Liao et al., 2023). E de acordo Lu et al. (2022) a redução de alguns taxa especialmente de Acidobacteria que podem ser usadas como bactérias indicadoras de ambientes desprovidos de nutrientes, pode indicar que a restauração ecológica reduziu a degradação do solo.

Em nível de família, nos três solos a família Nitrobacteraceae representante do filo Pseudomonadota/classe Alphaproteobacteria foi a dominante. Considerando as dez famílias mais abundantes, sua maior abundância relativa foi encontrada na área de preservação (36,53%), seguida de restauração (28,55%) e a menor em áreas agrícolas (23,76%).

O gênero *Bradyrhizobium* representante da família Nitrobacteriaceae foi o mais abundante em todos os solos. Em estudo global sobre a dominância de taxa microbianos do solo, *Bradyrhizobium* apresentou-se como o gênero dominante em solos de todo o mundo (Delgado-Baquerizo et al., 2018). Embora muito conhecido pela sua capacidade de fixar nitrogênio e estabelecerem associações simbióticas com plantas leguminosas, formando os nódulos, também já foram encontrados em solos com poucas ou quase nenhuma leguminosa. Em um trabalho feito por Sarao et al. (2024) que buscou compreender a dinâmica populacional do gênero *Bradyrhizobium* em nível de espécie, foram encontradas três espécies de *Bradyrhizobium* isoladas de rizosfera e solo a granel que não foram identificadas em nódulos, evidenciando a habilidade saprofítica das espécies do gênero.

A família Streptomycetaceae foi a segunda mais abundante nos três solos. Esta família faz parte do filo Actinomycetota, o segundo mais abundante nas amostras. Tal filo foi mais abundante em solos agrícolas (18,63%), seguida de restauração (17,88%), e a menor abundância relativa foi observada em solos de preservação (16,05%). A família Streptomycetaceae é capaz de produzir compostos antimicrobianos, além de resistir a perturbações ambientais devido a produção de esporos de paredes espessas e apresentam características benéficas para as plantas (Wu et al., 2021).

Em amostras de solos agrícola e de restauração, Nocardiodaceae foi a terceira família mais abundante e corresponde a 11,78% e 9,86% da abundância relativa nas áreas, respectivamente. Na área de preservação, a família Micromonosporaceae/Filo Actinomycetota foi a mais abundante (7,4%). A família Micromonosporaceae é amplamente distribuída no solo e agrupa bactérias que desempenham importantes papéis na estabilidade nos ecossistemas dos solos (Ding et al., 2024).

As dez famílias mais abundantes e a similaridade entre a diversidade nas amostras de solo estão representadas na Figura 5A.

Em relação ao domínio Archaea, a família Haloarculaceae foi a mais representativa. Os representantes dessa família são halofílicos e, apesar de não termos avaliado a salinidade, os resultados das análises químicas apontam que as áreas possuem solos salinos, segundo a classificação proposta pela USDA (Yan et al., 2015). O sistema de classificação USDA categoriza solos afetados pela salinidade no mundo, agrupando-os em três categorias distintas podendo ser salinos, sódicos e salino-sódico. Dessa maneira, a proporção de microrganismos halofílicos tende a aumentar nestes solos, já que possuem enzimas tolerantes a sais que permitem a sobrevivência em ambientes salinos (Yan et al., 2015).

Nos diferentes gradientes ambientais o domínio Archaea não apresentou diferenças significativas em relação à diversidade e uniformidade (J'). Esses resultados também foram encontrados por Muñoz-Arenas et al. (2020) e isso pode estar relacionado com o fato de que as arqueas são microrganismos que possuem uma ampla capacidade enzimática que permitem com que sejam mais resilientes as alterações ecológicas em diferentes ecossistemas. Além disso, no mesmo estudo os autores também verificaram que a uniformidade da comunidade de arqueas era maior quando comparado com a comunidade bacteriana, podendo explicar a resposta desse grupo de procariotos frente as mudanças de uso de solo.

Quando analisada a diversidade beta calculada pela dissimilaridade de Bray-Curtis (Figura 5B), a comunidade de Archaea da área de restauração é ainda mais similar ao solo de preservação. Isso pode estar relacionado com o índice de diversidade de Simpson onde os resultados da área de restauração foi intermediário entre a agrícola e preservação, porém se mostra mais similar com a área de preservação. O índice de Simpson leva em consideração a dominância e a desigualdade entre os taxa (Finn, 2024).

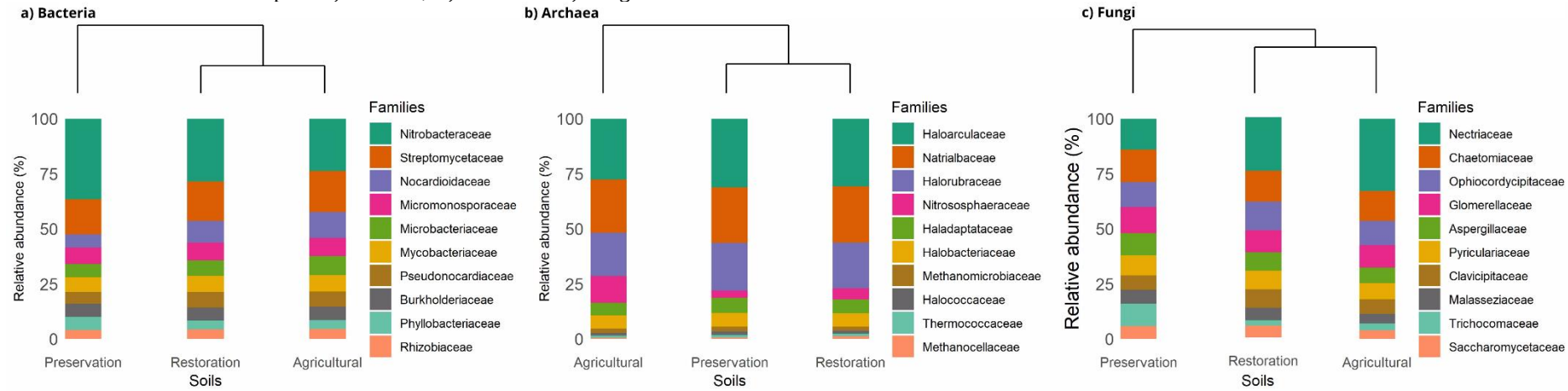
Alguns taxa no nível de família da área agrícola mostraram ser mais dominantes do que outros. Um exemplo é a família Nitrososphaeraceae/ordem Nitrososphaerales que é mais abundante em solos com atividades agrícolas (11.95%). Isso pode estar relacionado com o fato de que agroecossistemas tendem a ter níveis elevados de N devido à aplicação de fertilizantes; representantes deste grupo respondem positivamente à fertilização (Armbruster et al., 2020; Bueno

de Mesquita et al., 2023). As áreas de preservação e restauração mostraram-se mais semelhantes em relação à abundância de Nitrososphaeraceae (3.15% e 4.95%, respectivamente) (Figura 5B).

O filo fúngico que apresentou maior abundância em todas as amostras foi Ascomycota com abundâncias relativas de 87,79%, 85,51% e 82,34% nas amostras das áreas agrícola, restauração e preservação, respectivamente. A família Nectriaceae (Figura 5C) apresenta a maior abundância relativa em solos de área agrícola (32,92%) e de restauração (24,29%); seguida da família Chaetomiaceae na área agrícola (13,78%) e em área de restauração (13,42%). Já na área de preservação, Chaetomiaceae (14,55%), Nectriaceae (13,78%) e Glomerellaceae (13,34%) foram as mais abundantes.

O gênero *Fusarium*/família Nectriaceae abriga espécies fitopatogênicas e foi o mais abundante nos solos. Porém sua abundância relativa foi muito maior em solo agrícola (24,36%), na área de restauração a abundância diminuiu (16,94%) e na área de preservação a abundância foi (9,77%). Em uma pesquisa desenvolvida por Wan e colaboradores (2024), onde foi comparado um ecossistema fortemente degradado com outros dois em processo de restauração passiva e ativa, foram encontrados resultados semelhantes quanto a esse gênero, onde a abundância reduziu com a diminuição da degradação, sugerindo que a restauração pode modular efeito supressor do solo.

Figura 5- Abundância relativa das 10 famílias mais abundantes encontradas nos três solos. A dissimilaridade de Bray-Curtis foi calculada e os solos foram agrupados de acordo com suas similares para A) Bacteria, B) Archeae e C) Fungi.

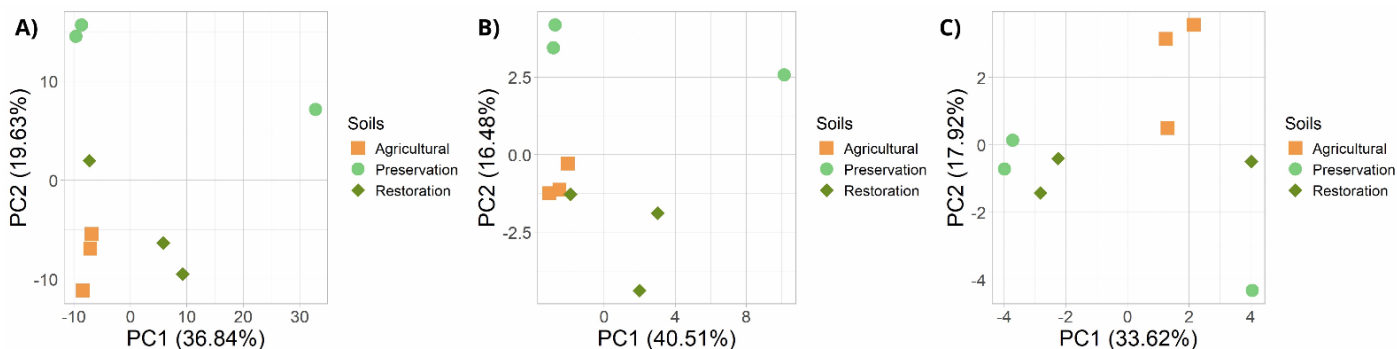


De maneira geral, as abundâncias relativas das famílias fúngicas no solo em preservação apresentaram valores mais semelhantes entre si. Isso pode ser associado ao mais elevado índice de Pielou (J), inclusive diferenciando-se das demais áreas, indicando que a área em questão apresenta maior equitabilidade em relação as abundâncias de cada organismo.

Uma análise de componentes principais (*principal component analysis*, PCA) baseada na composição taxonômica em nível de famílias de bactérias (Figura 6A), arqueas (Figura 6B) e fungos (Figura 6C) foi realizada visando compreender a variação nos grupos das áreas comparadas e observar sua distribuição de acordo com a distância relativa. No caso das bactérias, o eixo X foi responsável por 36,84% da variabilidade e observa-se uma distância biológica intermediária da área de restauração em relação às áreas agrícolas e de preservação, sugerindo um certo grau de recuperação de comunidades microbianas nativas desse ecossistema. No caso das famílias fúngicas o PC1 corresponde a 33,62% de variância e, a comunidade fúngica da área de restauração mostra-se mais próxima a área de preservação.

Em relação as arqueas, é possível observar que o PC1 responde por 40,51% da variabilidade, e apesar de apresentar abundâncias semelhantes a área de preservação para alguns taxa, os índices de diversidade (Tabela 2C) mostra que estes organismos não se diferenciaram estatisticamente para a maioria dos índices, o que demonstrou maior resiliência destes organismos frente as mudanças de uso de solo, portanto, não apresentaram um agrupamento definido (Figura 6B).

Figura 6- Comparação entre áreas de agricultura, restauração ecológica e preservação baseada na composição de bactérias (A), arqueas (B) e fungos (C) por meio de análise de componentes principais.



6.3.3 Estrutura Funcional das Comunidades Microbianas

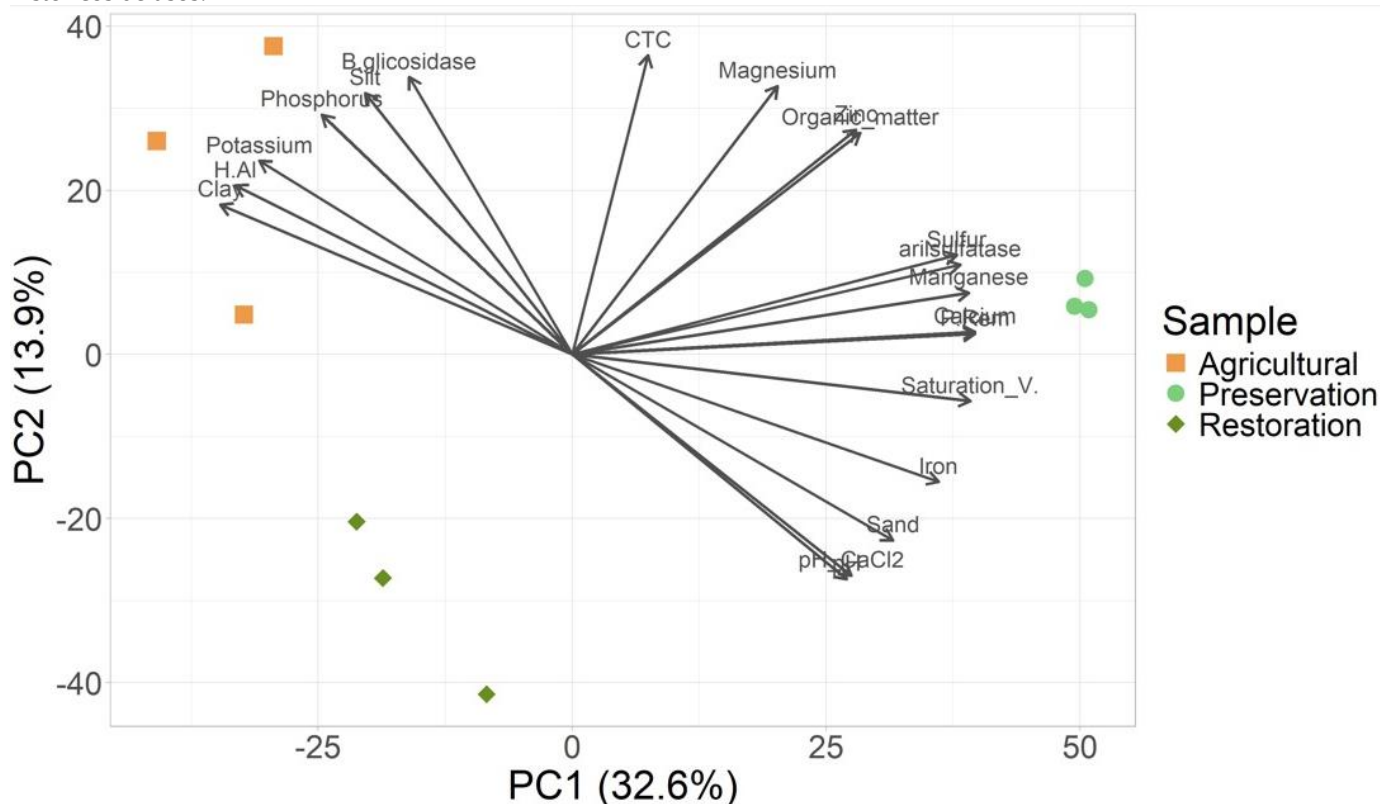
Em uma análise geral sobre a diversidade funcional atribuída por clusters de genes ortólogos (COG), foi verificado que os solos são enriquecidos de desidrogenases (COG1028 e COG1012) que fazem parte do transporte e metabolismo de lipídeos e hidrolases responsáveis pelo metabolismo de coenzimas (COG0596). Além disso, o COG0745 também foi bem representativo e está envolvido em mecanismos de transdução de sinais, que são importantes para os microrganismos, pois fornecem suporte para que as bactérias tolerem a uma gama de fatores estressantes, diferenças ambientais e condições distintas de crescimento (Arumugam et al., 2021).

Dentre as funções atribuídas pelo COG também estão inclusas a categoria relacionada aos mecanismos de defesa, que se mostrou bem representada com os genes COG0577, COG1131 e COG1132, relacionados ao sistema de transporte multidrogas do tipo ABC. Além disso genes relacionados com proteínas quinases (COG0515), acetilCoA sintase (COG0318) e (COG0841) que está envolvido em mecanismos de defesa, foram prevalentes nos três solos.

Estes representam os dez COGs mais abundantes encontrados em comum nos solos com diferentes históricos de uso (Tabela S10) e a maioria não apresentou diferenças significativas entre as diferentes áreas. Somente COG0841 e COG0596 diferenciaram-se estatisticamente ($P < 0,05$). O COG0841 que faz parte da categoria de mecanismos de defesa, e mostrou maior abundância na área de preservação, e menor em área agrícola e novamente a área de restauração permaneceu em posição intermediária. Para o COG0596, que representa uma superfamília de hidrolases alfa/beta, os resultados foram semelhantes, onde a maior concentração foi em área de vegetação nativa, o valor intermediário na área de restauração e a área agrícola foi onde a menor abundância foi encontrada.

Em uma análise de componentes principais (Figura 7) onde PC1 foi responsável por 32,6% de variação entre as amostras, indicou que a diversidade funcional da área agrícola é mais distante da área de preservação e a área de restauração mais uma vez ficou em uma posição intermediária, indicando que a composição de genes funcionais foram afetados pelo histórico de uso do solo.

Figura 7- Análise de componentes principais (PCA) baseado na composição funcional em solos com diferentes históricos de usos.



Observando as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, é possível notar que a diversidade funcional da área em preservação tem maior influência de matéria orgânica, pH, concentração de areia e atividade da enzima arilsulfatase. Por outro lado, a diversidade funcional encontrada em área agrícola teve maior influência da enzima beta-glicosidase. A atividade enzimática do solo é um bom indicador para avaliação da qualidade e dos componentes biológicos do solo (Barbosa et al., 2023).

A área agrícola apresentou menor teor de matéria orgânica. Normalmente ecossistemas agrícolas possuem menores teores de matéria orgânica do solo, o que torna o solo mais susceptível a degradação, que consequentemente influenciará a diversidade microbiana e suas respectivas funções no ambiente (Siles et al., 2024).

Em uma análise de abundâncias diferenciais de genes funcionais realizada por meio do Deseq (Love et al., 2014) foram feitas duas comparações: uma delas comparou a área de preservação com a área agrícola (Figura 8A), a outra foi entre área de preservação com a área de restauração (Figura 8B). Os COGs diferencialmente abundantes foram distribuídos em quase todas

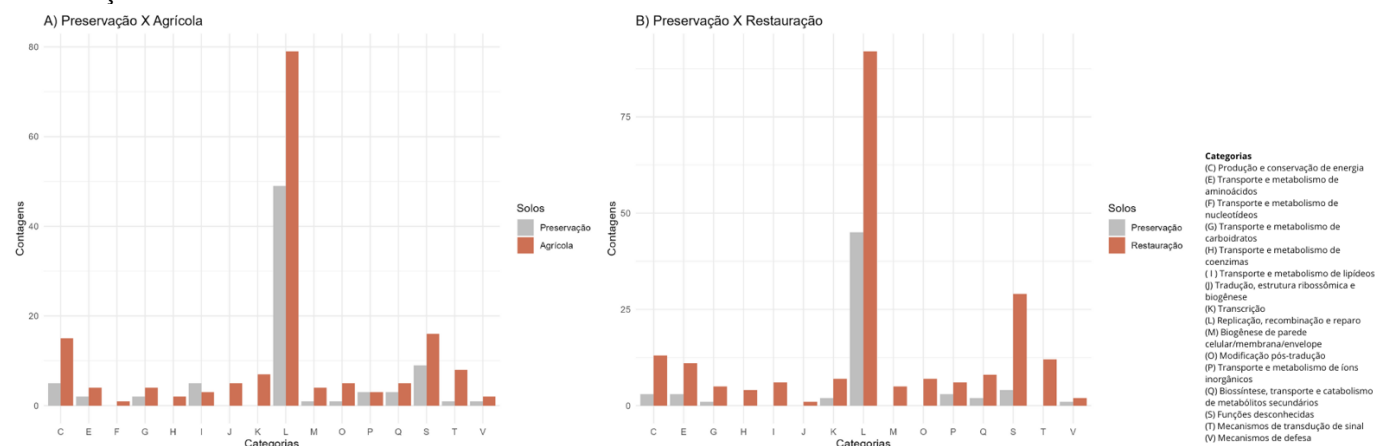
as categorias (Figura 8). Em ambas as análises, a área de preservação apresentou menores abundâncias diferenciais em relação as categorias encontradas. Resultados semelhantes foram encontrados por Pedrinho et al. (2019), onde as áreas com diferentes históricos de usos mostram-se mais resilientes em relação a diversidade funcional, indicando redundância funcional das comunidades microbianas.

Na primeira comparação (Figura 8A) foi visto que genes envolvidos na Replicação, recombinação e reparação (L) apresentaram maiores abundâncias diferenciais; a categoria S, que agrupa funções desconhecidas, foi a segunda mais abundante. Além disso, algumas categorias como J (tradução, estrutura ribossômica, biogênese), K (transcrição) e H (transporte e metabolismo de coenzimas) foram diferencialmente abundantes somente em área agrícola.

Na segunda comparação demonstrada na Figura 8B, novamente as categorias L e S mostraram mais diferenças. Os genes relacionados a replicação, recombinação e reparação foram altamente abundantes devido às transposases, em ambas as comparações. Genes relacionados a produção e conversão de energia (C) também foram abundantes, onde a área de restauração mostrou mais genes diferenciais (9,2%) e menor abundância (5,6%) em área de preservação.

Além disso, a categoria T demonstrou-se diferencialmente abundante somente na área de restauração. Portanto, nas áreas agrícolas e de restauração, quando comparadas com a área de vegetação nativa, os genes relacionados com mecanismos de transdução de sinal foram mais expressivos, provavelmente pela necessidade contínua de respostas dessas comunidades frente a estresses ambientais (Zhao et al., 2023).

Figura 8 - Análise de Grupos Ortólogos diferencialmente abundantes A) Preservação vs agrícola; B) Preservação vs Restauração.



6.3.4 Considerações Finais

Apesar de trabalhos anteriores (Guo et al., 2018; Siles et al., 2024) avaliarem os efeitos do processo de restauração a longo prazo, em apenas cinco anos de restauração passiva, ou seja, sem interferências humanas, foram observadas respostas na estrutura taxonômica e funcional de comunidades microbianas do solo, sobretudo de bactérias. Considerando a problemática atual referente à conversão de áreas nativas de Campos Naturais em monoculturas e a subsequente degradação dessas áreas, nossos resultados apontam que os solos em questão exibem grande potencial de restauração a curto prazo, desde que respeitadas as características de cada ecossistema.

REFERÊNCIAS

- ARMBRUSTER, M. et al. Bacterial and archaeal taxa are reliable indicators of soil restoration across distributed calcareous grasslands. **European journal of soil science**, v. 72, n. 6, p. 2430–2444, 2021.
- ARUMUGAM, M. et al. Metagenomic analysis of microbial community affiliated with termitarium reveals high lignocellulolytic potential. **Current microbiology**, v. 78, n. 4, p. 1551–1565, 2021.
- BARBOSA, J. Z. et al. Soil enzymatic activity in Brazilian biomes under native vegetation and contrasting cropping and management. **Applied soil ecology: a section of Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 190, n. 105014, p. 105014, 2023.
- BREITWIESER, F. P.; LU, J.; SALZBERG, S. L. A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly. **Briefings in bioinformatics**, v. 20, n. 4, p. 1125–1136, 2019.
- BUCHFINK, B.; REUTER, K.; DROST, H.-G. Sensitive protein alignments at tree-of-life scale using DIAMOND. **Nature methods**, v. 18, n. 4, p. 366–368, 2021.
- BUENO DE MESQUITA, C. P. et al. Adverse impacts of Roundup on soil bacteria, soil chemistry and mycorrhizal fungi during restoration of a Colorado grassland. **Applied soil ecology: a section of Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 185, n. 104778, p. 104778, 2023.
- BUISSON, E. et al. Resilience and restoration of tropical and subtropical grasslands, savannas, and grassy woodlands. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 94, n. 2, p. 590–609, 2019.
- CHEN, S. et al. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 34, n. 17, p. i884–i890, 2018.

DELGADO-BAQUERIZO, M. et al. A global atlas of the dominant bacteria found in soil. **Science (New York, N.Y.)**, v. 359, n. 6373, p. 320–325, 2018.

DING, M. et al. Continuous cropping system altered soil microbial communities and nutrient cycles. **Frontiers in microbiology**, v. 15, 2024.

DONG, L. et al. Soil degradation influences soil bacterial and fungal community diversity in overgrazed alpine meadows of the Qinghai-Tibet Plateau. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, 2021.

DRAGONE, N. B. et al. Taxonomic and genomic attributes of oligotrophic soil bacteria. **ISME communications**, v. 4, n. 1, 2024.

FINN, D. R. A metagenomic alpha-diversity index for microbial functional biodiversity. **FEMS microbiology ecology**, v. 100, n. 3, p. fae019, 2024.

GALPERIN, M. Y. et al. COG database update: focus on microbial diversity, model organisms, and widespread pathogens. **Nucleic acids research**, v. 49, n. D1, p. D274–D281, 2021.

GUO, Y. et al. Natural revegetation of a semiarid habitat alters taxonomic and functional diversity of soil microbial communities. **The Science of the total environment**, v. 635, p. 598–606, 2018.

HUERTA-CEPAS, J. et al. eggNOG 5.0: a hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. **Nucleic acids research**, v. 47, n. D1, p. D309–D314, 2019.

LANGMEAD, B. et al. Scaling read aligners to hundreds of threads on general-purpose processors. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 35, n. 3, p. 421–432, 2019. Langmead, B., Wilks, C., Antonescu, V., & Charles, R. (2019).

LI, X. et al. Land use change from upland to paddy field in Mollisols drives soil aggregation and associated microbial communities. **Applied soil ecology: a section of Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 146, n. 103351, p. 103351, 2020.

LIAO, J. et al. Soil microbial community and their functional genes during grassland restoration. **Journal of environmental management**, v. 325, n. 116488, p. 116488, 2023.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome biology**, v. 15, n. 12, 2014.

LU, Z.-X. et al. Effects of different vegetation restoration on soil nutrients, enzyme activities, and microbial communities in degraded karst landscapes in southwest China. **Forest ecology and management**, v. 508, n. 120002, p. 120002, 2022.

MEENA, A.; RAO, K. S. Assessment of soil microbial and enzyme activity in the rhizosphere zone under different land use/cover of a semiarid region, India. **Ecological processes**, v. 10, n. 1, 2021.

MELO, V. F. et al. Soil bacterial diversities and response to deforestation, land use and burning in North Amazon, Brazil. **Applied soil ecology: a section of Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 158, n. 103775, p. 103775, 2021.

MIOLA, D. T. B.; RAMOS, V. D. V.; SILVEIRA, F. A. O. A brief history of research *incampo rupestre*: identifying research priorities and crevisiting the geographical distribution of an ancient, widespread Neotropical biome. **Biological journal of the Linnean Society. Linnean Society of London**, v. 133, n. 2, p. 464–480, 2021.

MENDES, I. DE C. et al. Critical limits for microbial indicators in tropical Oxisols at post-harvest: The FERTBIO soil sample concept. **Applied soil ecology: a section of Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 139, p. 85–93, 2019.

MUÑOZ-ARENAS, L. C. et al. Soil microbial diversity drops with land-use change in a high mountain temperate forest: a metagenomics survey. **Environmental microbiology reports**, v. 12, n. 2, p. 185–194, 2020.

NURK, S. et al. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. **Genome research**, v. 27, n. 5, p. 824–834, 2017.

OKSANEN, J. Vegan: Community Ecology Package. R package version 2.6-0. 2024. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>. Acesso em: 10 dez. 2023.

ORGIAZZI, A. et al. A knowledge-based approach to estimating the magnitude and spatial patterns of potential threats to soil biodiversity. **The Science of the total environment**, v. 545–546, p. 11–20, 2016.

OVERBECK, G. E. et al. Placing Brazil's grasslands and savannas on the map of science and conservation. **Perspectives in plant ecology, evolution and systematics**, v. 56, n. 125687, p. 125687, 2022.

PARR, C. L. et al. Tropical grassy biomes: misunderstood, neglected, and under threat. **Trends in ecology & evolution**, v. 29, n. 4, p. 205–213, 2014.

PAULITSCH, F. et al. *Paraburkholderia guartelaensis* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from nodules of *Mimosa gymnas* in an ecotone considered as a hotspot of biodiversity in Brazil. **Archives of microbiology**, v. 201, n. 10, p. 1435–1446, 2019.

PEDRINHO, A. et al. Forest-to-pasture conversion and recovery based on assessment of microbial communities in Eastern Amazon rainforest. **FEMS microbiology ecology**, v. 95, n. 3, p. fty236, 2019.

RITTER, L. M. O.; RIBEIRO, M. C.; MORO, R. S. Composição florística e fitofisionomia de remanescentes disjuntos de Cerrado nos Campos Gerais, PR, Brasil - limite austral do bioma. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 3, p. 379–414, 2010.

SARAO, S. K. et al. Bradyrhizobium and the soybean rhizosphere: Species level bacterial population dynamics in established soybean fields, rhizosphere and nodules. **Plant and soil**, 2024.

SEEMANN, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 30, n. 14, p. 2068–2069, 2014.

SILES, J. A. et al. Long-term restoration with organic amendments is clearer evidenced by soil organic matter composition than by changes in microbial taxonomy and functionality. **Applied soil ecology: a section of Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 198, n. 105383, p. 105383, 2024.

SUN, Y. et al. Land-use changes alter soil bacterial composition and diversity in tropical forest soil in China. **The Science of the total environment**, v. 712, n. 136526, p. 136526, 2020.

VAN DER HEYDE, M. et al. Changes in soil microbial communities in post mine ecological restoration: Implications for monitoring using high throughput DNA sequencing. **The Science of the total environment**, v. 749, n. 142262, p. 142262, 2020.

VIEIRA, A. F.; MOURA, M.; SILVA, L. Soil metagenomics in grasslands and forests – A review and bibliometric analysis. **Applied soil ecology: a section of Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 167, n. 104047, p. 104047, 2021.

WAN, P. et al. Fungal community composition changes and reduced bacterial diversity drive improvements in the soil quality index during arable land restoration. **Environmental research**, v. 244, n. 117931, p. 117931, 2024.

WICKHAM, Hadley. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Nova York: **Springer-Verlag**, 2016. ISBN 978-3-319-24277-4

WOOD, D. E.; LU, J.; LANGMEAD, B. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. **Genome biology**, v. 20, n. 1, 2019.

YAN, N. et al. Influence of salinity and water content on soil microorganisms. **International soil and water conservation research**, v. 3, n. 4, p. 316–323, 2015.

YANG, Y.; DOU, Y.; AN, S. Testing association between soil bacterial diversity and soil carbon storage on the Loess Plateau. **The Science of the total environment**, v. 626, p. 48–58, 2018.

YANG, W. et al. Increased soil bacterial abundance but decreased bacterial diversity and shifted bacterial community composition following secondary succession of Old-Field. **Forests**, v. 13, n. 10, p. 1628, 2022.

WOOD, D. E.; SALZBERG, S. L. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. **Genome biology**, v. 15, n. 3, 2014.

WU, A.-L. et al. Sorghum rhizosphere effects reduced soil bacterial diversity by recruiting specific bacterial species under low nitrogen stress. **The Science of the total environment**, v. 770, n. 144742, p. 144742, 2021.

ZABEL, F. et al. Global impacts of future cropland expansion and intensification on agricultural markets and biodiversity. **Nature communications**, v. 10, n. 1, 2019.

ZHANG, X. et al. Metagenomic analysis reveals the effect of revegetation types on the function of soil microorganisms in carbon and nitrogen metabolism in the open-cast mining area. **Plant and soil**, 2024.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1 – Concentração de DNA total extraído.

Amostra	Absorbância (260/280)	Absorbância (260/230)	Concentração
Branco	0	0	0
E 10 T	2.055,0	0,3	902,59ng/uL
E 10 R	2.034,0	1.989,0	844,26 ng/uL
E 12 T	2.103,0	1.222,0	996,27ng/uL
E 12 R	2068,0	2089,0	709,29 ng/uL
E 15 T	2057,0	1866,0	1034,71ng/uL
E 15 R	2101,0	2183,0	756,43ng/uL
P 1 T	1958,0	0,629	1465,44ng/uL
P 1 R	1820,0	1927,0	1502,99ng/uL
P 2 T	1860,0	2102,0	2134,19ng/uL
P 2 R	2002,0	0,601	1164,62 ng/uL
P 9 T	1991,0	1392,0	2202,40 ng/uL
P 9 R	1946,0	2215,0	1871,01 ng/uL
FE 3 R	1994,0	1852,0	940,53 ng/uL
FE 3 T	1985,0	1672	871,73 ng/uL
FE 5 R	2103,0	0,723	753,51 ng/uL
FE 5 T	2174,0	0,401	874,38 ng/uL
FE 4 T	2021,0	1821,0	725,22 ng/uL
FE 4 R	1916,0	2121,0	990,78 ng/uL

Tabela S2- Propriedades físico-químicas e biológicas do solo.

Parâmetros	Agrícola	Restauração	Preservação
CTC	13,39	12,61	13,36
pH	5,74	6,06	6,15
P mehlich-1 (mg/dm ³)	26,07	8,22	5,18
Potássio (cmolc/dm ³)	0,68	0,30	0,11
Ferro (mg/dm ³)	138,01	197,04	257,70
Matéria orgânica (g/dm ³)	32,72	27,38	41,85
β-glicosidase	107,88	71,75	77,26
arilsulfatase	125,95	127,38	180,95
Areia	46%	64%	74%
Argila	43%	31%	5%
Silte	11%	5%	21%

Tabela S3 – Porcentagem de *reads* classificadas.

Amostras	Porcentagem de <i>reads</i> classificadas	Bacterias	Fungos
Agrícola_8	34,2%	33.40%	0.07%
Agrícola_9	34,4%	33.60%	0.09%
Agrícola_10	36.80%	36%	0.08%
Preservação_11	31.60%	30.90%	0.05%
Preservação_12	32.10%	31.50%	0.06%
Preservação_13	31.90%	31.20%	0.05%
Restauração_14	33.20%	32.50%	0.06%
Restauração_15	32.30%	31.50%	0.05%
Restauração_16	33.90%	33.10%	0.07%

Tabela S4- Abundância de filos bacterianos na área de restauração.

Filos	Restauração _14	Abundância Relativa (%)	Restauração _15	Abundância Relativa (%)	Restauração _16	Abundância Relativa (%)
Pseudomonadota	435575	46.68%	402091	48.74%	445855	45.80%
Actinomycetota	404898	43.39%	339408	41.14%	434247	44.61%
Planctomycetota	20398	2.19%	19866	2.41%	20635	2.12%
Myxococcota	20057	2.15%	17118	2.08%	19665	2.02%
Bacillota	12536	1.34%	10958	1.33%	11781	1.21%
Acidobacteriota	10382	1.11%	9525	1.16%	10293	1.06%
Bacteroidota	7331	0.79%	6571	0.80%	9132	0.94%
Thermodesulfobacteriota	4757	0.51%	4348	0.53%	4716	0.48%
Gemmatimonadota	3287	0.35%	2738	0.33%	3171	0.33%
Cyanobacteriota	2661	0.29%	2224	0.27%	2669	0.27%
Verrucomicrobiota	2483	0.27%	2232	0.27%	2503	0.26%
Deinococcota	2477	0.27%	2232	0.27%	2494	0.26%
Chloroflexota	1568	0.17%	1442	0.17%	1519	0.16%
Nitrospirota	1218	0.13%	915	0.11%	1228	0.13%
Rhodothermota	549	0.06%	517	0.06%	527	0.05%
Spirochaetota	532	0.06%	522	0.06%	558	0.06%
Thermomicrobiota	383	0.04%	386	0.05%	416	0.04%
Armatimonadota	286	0.03%	289	0.04%	323	0.03%

Chlorobiota	271	0.03%	270	0.03%	274	0.03%
Vulcanimicrobiota	266	0.03%	223	0.03%	237	0.02%
Synergistota	250	0.03%	209	0.03%	247	0.03%
Campylobacterota	188	0.02%	196	0.02%	241	0.02%
Bdellovibrionota	120	0.01%	96	0.01%	111	0.01%
Kiritimatiellota	72	0.01%	68	0.01%	74	0.01%
Nitrospinota	70	0.01%	55	0.01%	73	0.01%
Thermotogota	67	0.01%	39	0.00%	64	0.01%
Aquificota	46	0.00%	45	0.01%	48	0.00%
Mycoplasmata	45	0.00%	58	0.01%	53	0.01%
Chlamydiota	45	0.00%	38	0.00%	47	0.00%
Candidatus Saccharibacteria	34	0.00%	27	0.00%	52	0.01%
Fusobacteriota	33	0.00%	25	0.00%	32	0.00%
Candidatus Bipolaricaulota	28	0.00%	26	0.00%	35	0.00%
Candidatus Omnitrophota	23	0.00%	18	0.00%	36	0.00%
Ignavibacteriota	19	0.00%	12	0.00%	15	0.00%
Deferribacterota	18	0.00%	19	0.00%	23	0.00%
Balneolota	17	0.00%	17	0.00%	20	0.00%
Elusimicrobiota	16	0.00%	8	0.00%	9	0.00%
Calditrichota	15	0.00%	25	0.00%	21	0.00%
Candidatus Fervidibacteria	13	0.00%	14	0.00%	17	0.00%
Chrysiogenota	13	0.00%	18	0.00%	19	0.00%
Fibrobacterota	9	0.00%	14	0.00%	9	0.00%
Lentisphaerota	5	0.00%	4	0.00%	2	0.00%
Dictyoglomota	5	0.00%	9	0.00%	2	0.00%
Caldisericota	5	0.00%	8	0.00%	8	0.00%
Coprothermobacterota	4	0.00%	4	0.00%	2	0.00%
Candidatus Cloacimonadota	3	0.00%	2	0.00%	2	0.00%
Candidatus Absconditabacteria	2	0.00%	5	0.00%	3	0.00%
Thermodesulfobiota	1	0.00%	2	0.00%	0	0
Atribacterota	0	0	2	0.00%	1	0.00%

Tabela S5 - Abundância de filos bacterianos na área de preservação.

Filos	Preservação _11	Abundância Relativa (%)	Preservação _12	Abundância Relativa (%)	Preservação _13	Abundância Relativa (%)
Pseudomonadota	465533	55.47%	477070	55.50%	622291	55.26%
Actinomycetota	298953	35.62%	307158	35.73%	403634	35.84%
Planctomycetota	17922	2.14%	18893	2.20%	24779	2.20%
Myxococcota	14264	1.70%	14509	1.69%	20045	1.78%
Bacillota	10491	1.25%	10032	1.17%	11945	1.06%
Acidobacteriota	8453	1.01%	9019	1.05%	11856	1.05%
Bacteroidota	6246	0.74%	5414	0.63%	7239	0.64%
Thermodesulfobacteriota	4107	0.49%	4148	0.48%	5801	0.52%
Cyanobacteriota	2308	0.28%	2209	0.26%	3093	0.27%
Deinococcota	1991	0.24%	1970	0.23%	2858	0.25%
Verrucomicrobiota	1987	0.24%	1999	0.23%	2826	0.25%
Gemmatimonadota	1865	0.22%	2029	0.24%	2660	0.24%
Chloroflexota	1100	0.13%	1110	0.13%	1452	0.13%
Nitrospirota	932	0.11%	1064	0.12%	1389	0.12%
Spirochaetota	577	0.07%	544	0.06%	750	0.07%
Rhodothermota	430	0.05%	479	0.06%	653	0.06%
Thermomicrobiota	300	0.04%	293	0.03%	451	0.04%
Synergistota	246	0.03%	218	0.03%	317	0.03%
Armatimonadota	236	0.03%	249	0.03%	374	0.03%
Chlorobiota	229	0.03%	239	0.03%	320	0.03%
Campylobacterota	195	0.02%	185	0.02%	228	0.02%
Vulcanimicrobiota	161	0.02%	189	0.02%	242	0.02%
Chlamydiota	108	0.01%	66	0.01%	93	0.01%
Bdellovibrionota	98	0.01%	98	0.01%	140	0.01%
Kiritimatiellota	68	0.01%	74	0.01%	103	0.01%
Nitrospinota	63	0.01%	51	0.01%	66	0.01%
Thermotogota	56	0.01%	43	0.01%	79	0.01%
Mycoplasmata	37	0.00%	37	0.00%	43	0.00%
Aquificota	27	0.00%	33	0.00%	58	0.01%
Candidatus Bipolaricaulota	25	0.00%	24	0.00%	38	0.00%
Candidatus Saccharibacteria	23	0.00%	19	0.00%	25	0.00%
Calditrichota	22	0.00%	24	0.00%	24	0.00%
Fusobacteriota	22	0.00%	15	0.00%	25	0.00%
Deferribacterota	18	0.00%	23	0.00%	25	0.00%
Chrysiogenota	18	0.00%	14	0.00%	16	0.00%
Fibrobacterota	15	0.00%	4	0.00%	15	0.00%

Candidatus Omnitrophota	13	0.00%	24	0.00%	16	0.00%
Balneolota	13	0.00%	18	0.00%	21	0.00%
Ignavibacteriota	12	0.00%	14	0.00%	16	0.00%
Thermodesulfobiota	9	0.00%	1	0.00%	6	0.00%
Elusimicrobiota	6	0.00%	14	0.00%	10	0.00%
Caldisericota	6	0.00%	6	0.00%	4	0.00%
Candidatus Fervidibacteria	5	0.00%	8	0.00%	15	0.00%
Dictyoglomota	4	0.00%	3	0.00%	11	0.00%
Candidatus Absconditabacteria	2	0.00%	6	0.00%	7	0.00%
Atribacterota	2	0.00%	4	0.00%	2	0.00%
Coprothermobacterota	2	0.00%	2	0.00%	4	0.00%
Lentisphaerota	1	0.00%	1	0.00%	8	0.00%
Candidatus Cloacimonadota	1	0.00%	4	0.00%	1	0.00%

Tabela S6 – Abundância de filos bacterianos na área de agrícola.

Filos	Agrícola_8	Abundância Relativa (%)	Agrícola_9	Abundância Relativa (%)	Agrícola_10	Abundância Relativa (%)
Pseudomonadota	400727	45.85%	395777	46.77%	401143	43.77%
Actinomycetota	385561	44.12%	361476	42.71%	429982	46.91%
Planctomycetota	20400	2.33%	20009	2.36%	19731	2.15%
Myxococcota	17329	1.98%	18673	2.21%	18055	1.97%
Acidobacteriota	11092	1.27%	11704	1.38%	10176	1.11%
Bacillota	10936	1.25%	10919	1.29%	10633	1.16%
Bacteroidota	8095	0.93%	7935	0.94%	8168	0.89%
Thermodesulfobacteriota	4036	0.46%	4046	0.48%	3700	0.40%
Gemmatimonadota	3312	0.38%	3240	0.38%	3229	0.35%
Verrucomicrobiota	2319	0.27%	2660	0.31%	2216	0.24%
Cyanobacteriota	2258	0.26%	2228	0.26%	2096	0.23%
Deinococcota	2257	0.26%	2218	0.26%	2093	0.23%
Chloroflexota	1247	0.14%	1172	0.14%	1316	0.14%
Nitrospirota	1226	0.14%	1081	0.13%	1006	0.11%
Spirochaetota	502	0.06%	449	0.05%	423	0.05%
Rhodothermota	497	0.06%	519	0.06%	473	0.05%
Thermomicrobiota	323	0.04%	373	0.04%	392	0.04%
Armatimonadota	302	0.03%	228	0.03%	275	0.03%
Chlorobiota	245	0.03%	251	0.03%	233	0.03%

Synergistota	225	0.03%	260	0.03%	240	0.03%
Vulcanimicrobiota	220	0.03%	225	0.03%	202	0.02%
Campylobacterota	193	0.02%	199	0.02%	218	0.02%
Bdellovibrionota	93	0.01%	101	0.01%	92	0.01%
Kiritimatiellota	65	0.01%	63	0.01%	46	0.01%
Nitrospinota	65	0.01%	57	0.01%	46	0.01%
Thermotogota	62	0.01%	57	0.01%	41	0.00%
Candidatus Bipolaricaulota	41	0.00%	29	0.00%	36	0.00%
Chlamydiota	40	0.00%	39	0.00%	42	0.00%
Aquificota	34	0.00%	32	0.00%	38	0.00%
Mycoplasmata	32	0.00%	39	0.00%	38	0.00%
Candidatus Saccharibacteria	26	0.00%	31	0.00%	26	0.00%
Candidatus Omnitrophota	23	0.00%	13	0.00%	20	0.00%
Deferribacterota	22	0.00%	17	0.00%	22	0.00%
Fusobacteriota	21	0.00%	31	0.00%	23	0.00%
Ignavibacteriota	15	0.00%	9	0.00%	13	0.00%
Balneolota	13	0.00%	16	0.00%	8	0.00%
Calditrichota	13	0.00%	19	0.00%	7	0.00%
Fibrobacterota	12	0.00%	17	0.00%	11	0.00%
Elusimicrobiota	12	0.00%	10	0.00%	8	0.00%
Candidatus Fervidibacteria	11	0.00%	10	0.00%	13	0.00%
Chrysiogenota	9	0.00%	23	0.00%	11	0.00%
Caldisericota	8	0.00%	4	0.00%	5	0.00%
Coprothermobacterota	6	0.00%	3	0.00%	1	0.00%
Candidatus Cloacimonadota	5	0.00%	1	0.00%	2	0.00%
Atribacterota	4	0.00%	2	0.00%	2	0.00%
Dictyoglomota	2	0.00%	3	0.00%	7	0.00%
Thermodesulfobiota	2	0.00%	0	0	2	0.00%
Candidatus Absconditabacteria	1	0.00%	2	0.00%	0	0
Lentisphaerota	0	0	5	0.00%	3	0.00%

Tabela S7 – Dez famílias bacterianas mais abundantes.

Famílias	Agrícola		Restauração		Preservação	
	Abundância	Abundância Relativa	Abundância	Abundância Relativa	Abundância	Abundância Relativa
Nitrobacteraceae	267071	23.766305	334238	28.557319	457831	36.534647
Streptomycetaceae	209372	18.631745	209376	17.8891	201198	16.055483
Mycobacteriaceae	84367	7.507711	84541	7.223189	84541	6.746322
Micromonosporaceae	93194	8.293214	93936	8.025899	93936	7.496038
Nocardiodaceae	131913	11.738768	115515	9.86961	74942	5.980328
Burkholderiaceae	69482	6.183114	69654	5.951243	75526	6.026931
Phyllobacteriaceae	43896	3.906249	46003	3.9305	73413	5.858315
Microbacteriaceae	96664	8.602005	82606	7.057863	74005	5.905556
Rhizobiaceae	50713	4.512885	50713	4.332922	50713	4.046868
Pseudonocardiaceae	77066	6.858004	83829	7.162356	67037	5.349513

Tabela S8 – Dez famílias fúngicas mais abundantes.

Famílias	Agrícola		Restauração		Preservação	
	Abundância	Abundância Relativa	Abundância	Abundância Relativa	Abundância	Abundância Relativa
Nectriaceae	1570	32.927852	921	24.294381	502	13.783635
Chaetomiaceae	645	13.527685	533	14.059615	530	14.552444
Ophiocordycipitaceae	525	11.010906	496	13.083619	404	11.092806
Glomerellaceae	483	10.130034	377	9.944606	486	13.344316
Aspergillaceae	338	7.088926	316	8.335532	363	9.967051
Trichocomaceae	156	3.271812	90	2.374044	359	9.857221
Pyrulariaceae	357	7.487416	325	8.572936	326	8.951126
Clavicipitaceae	313	6.564597	314	8.282775	237	6.507414
Malasseziaceae	201	4.215604	217	5.724083	225	6.177924
Saccharomycetaceae	180	3.775168	202	5.328409	210	5.766063

Tabela S9 – Dez famílias do domínio Archaea mais abundantes.

Famílias	Agrícola		Restauração		Preservação	
	Abundância	Abundância Relativa	Abundância	Abundância Relativa	Abundância	Abundância Relativa
Haloarculaceae	5486	27.6414571	6110	30.7204988	5896	31.1809191
Natrialbaceae	4791	24.1396685	5098	25.632259	4791	25.337141
Halorubraceae	3932	19.8115584	4130	20.7652471	4093	21.6457771
Haladaptataceae	1150	5.7943266	1272	6.395495	1309	6.9226294
Nitrososphaeraceae	2373	11.956467	984	4.9474584	595	3.1466497
Halobacteriaceae	1199	6.0412153	1198	6.02343	1199	6.3408959
Methanomicrobiaceae	377	1.8995314	371	1.8653527	393	2.0783754
Halococcaceae	253	1.2747519	256	1.2871436	287	1.5177958
Thermococcaceae	190	0.9573235	249	1.2519483	250	1.3221217
Methanocellaceae	96	0.4837003	221	1.111167	96	0.5076947

Tabela S10 – Valores das médias seguido dos respectivos desvios padrões referentes aos dez COGs mais abundantes nos três solos.

COG	Agrícola	Restauração	Preservação
	Média	Média	Média
COG1028 (I)	377715.7 (17534.985)	409161.3 (32911.409)	456713.7 (69573.43)
COG0841 (V)	305766.7 (5482.173)	358844.3 (5815.511)	444769 (73353.29)
COG1012 (I)	276886.7 (12881.681)	289996.3 (26876.668)	307646.3 (53719.83)
COG0577 (V)	225852 (14302.613)	261271.7 (17467.867)	268496.3 (46195.58)
COG0745 (TK)	227317 (9564.006)	248822.7 (19096.532)	242394.3 (36314.42)
COG0318 (I)	222239 (8007.084)	251162.3 (21885.572)	277848 (47294.14)
COG0515 (T)	235273 (11376.771)	254005.3 (9917.716)	263144.7 (48242.98)
COG0596 (HR)	198952.3 (12712.141)	225009.7 (16384.151)	265532 (40911.71)
COG1131 (V)	172372.3 (5515.04)	182810.3 (9880.761)	180978.3 (28468.86)
COG1132 (V)	169963 (4806.788)	178775.7 (8489.54)	177523.3 (26088.46)

7 CONCLUSÃO

Por meio da análise metagenômica do solo, foi possível concluir que as alterações no uso de solo impactam a comunidade microbiana de bactérias e fungos quanto à diversidade alfa, equitabilidade ($p < 0,05$) e beta diversidade, enquanto a comunidade de arqueas apresenta maior resiliência. Além disso, foi possível notar diferentes padrões na composição funcional da microbiota dos solos, indicando que o histórico de uso do solo afetou a diversidade funcional dos microrganismos. Por fim, observamos que um processo de cinco anos de restauração ecológica passiva de Campos Nativos já reflete-se em mudança substancial na estrutura de comunidades do solo em direção à sua composição nativa.

REFERÊNCIAS

- Amit Roy, S. R. (2014). Molecular markers in phylogenetic studies-A review. **Journal of phylogenetics & evolutionary biology**, 02(02).
- BALD, D. R. et al. Microbiota do solo: a diversidade invisível e a sua importância. **Bio Diverso**, v. 1, n. 1, 2021.
- BÁRCENAS-MORENO, G. et al. Adaptation of soil microbial communities to temperature: comparison of fungi and bacteria in a laboratory experiment. **Global change biology**, v. 15, n. 12, p. 2950–2957, 2009.
- BAUDE, M.; MEYER, B. C.; SCHINDEWOLF, M. Land use change in an agricultural landscape causing degradation of soil based ecosystem services. **The Science of the total environment**, v. 659, p. 1526–1536, 2019.
- BENSON, D. A. et al. GenBank. **Nucleic acids research**, v. 46, n. D1, p. D41–D47, 2018.
- BERG, G.; SMALLA, K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere: Plant species, soil type and rhizosphere communities. **FEMS microbiology ecology**, v. 68, n. 1, p. 1–13, 2009.
- BEUGNON, R. et al. Tree diversity and soil chemical properties drive the linkages between soil microbial community and ecosystem functioning. **ISME communications**, v. 1, n. 1, 2021.
- BREITWIESER, F. P.; LU, J.; SALZBERG, S. L. A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly. **Briefings in bioinformatics**, v. 20, n. 4, p. 1125–1136, 2019.
- BROCKETT, B. F. T.; PRESCOTT, C. E.; GRAYSTON, S. J. Soil moisture is the major factor influencing microbial community structure and enzyme activities across seven biogeoclimatic zones in western Canada. **Soil biology & biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 9–20, 2012.
- BROECKLING, C. D. et al. Root exudates regulate soil fungal community composition and diversity. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 3, p. 738–744, 2008.
- BUCKLEY, D. H.; SCHMIDT, T. M. The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation. **Microbial ecology**, v. 42, n. 1, p. 11–21, 2001.
- BUCHFINK, B.; REUTER, K.; DROST, H.-G. Sensitive protein alignments at tree-of-life scale using DIAMOND. **Nature methods**, v. 18, n. 4, p. 366–368, 2021.
- CARMO, M. R. B. do; MORO, R. S.; NOGUEIRA, M. K. F. de S. A vegetação florestal nos Campos Gerais. In: MELO, M. S.; MORO, R. S.; GUIMARÃES, G. B. Patrimônio natural dos Campos Gerais do Paraná. Ponta Grossa: Editora UEPG, 2007. Cap. 9, p.99-104.
- CARMONA, C. P. et al. Traits without borders: Integrating functional diversity across scales. **Trends in ecology & evolution**, v. 31, n. 5, p. 382–394, 2016.

- CHEN, S. et al. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 34, n. 17, p. i884–i890, 2018.
- COBAN, O.; DE DEYN, G. B.; VAN DER PLOEG, M. Soil microbiota as game-changers in restoration of degraded lands. **Science (New York, N.Y.)**, v. 375, n. 6584, 2022.
- COLE, J. R. et al. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. **Nucleic acids research**, v. 42, n. D1, p. D633–D642, 2014.
- CROWTHER, T. W. et al. The global soil community and its influence on biogeochemistry. **Science (New York, N.Y.)**, v. 365, n. 6455, 2019.
- D'ANDREANO, S.; CUSCÓ, A.; FRANCINO, O. Rapid and real-time identification of fungi up to species level with long amplicon nanopore sequencing from clinical samples. **Biology methods and protocols**, v. 6, n. 1, 2021.
- DE SOUZA, L. C.; PROCÓPIO, L. The profile of the soil microbiota in the Cerrado is influenced by land use. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 105, n. 11, p. 4791–4803, 2021.
- DELGADO-BAQUERIZO, M. et al. Microbial diversity drives multifunctionality in terrestrial ecosystems. **Nature communications**, v. 7, n. 1, 2016.
- DELGADO-BAQUERIZO, M. et al. A global atlas of the dominant bacteria found in soil. **Science (New York, N.Y.)**, v. 359, n. 6373, p. 320–325, 2018.
- DÍAZ, S. et al. Incorporating plant functional diversity effects in ecosystem service assessments. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 52, p. 20684–20689, 2007.
- DOUGLAS, G. M. et al. **PICRUSt2: An improved and customizable approach for metagenome inference**, v.2, 2019.
- DURAZZI, F. et al. Comparison between 16S rRNA and shotgun sequencing data for the taxonomic characterization of the gut microbiota. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, 2021.
- ESCALAS, A. et al. Microbial functional diversity: From concepts to applications. **Ecology and evolution**, v. 9, n. 20, p. 12000–12016, 2019.
- FADIJI, A. E.; BABALOLA, O. O. Metagenomics methods for the study of plant-associated microbial communities: A review. **Journal of microbiological methods**, v. 170, n. 105860, p. 105860, 2020.
- FALKOWSKI, P. G.; FENCHEL, T.; DELONG, E. F. The microbial engines that drive earth's biogeochemical cycles. **Science (New York, N.Y.)**, v. 320, n. 5879, p. 1034–1039, 2008.
- FIERER, N. Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. **Nature reviews. Microbiology**, v. 15, n. 10, p. 579–590, 2017.

FOSTER, J. A. et al. Measuring the microbiome: perspectives on advances in DNA-based techniques for exploring microbial life. **Briefings in bioinformatics**, v. 13, n. 4, p. 420–429, 2012.

FRØSLEV, T. G. et al. The biodiversity effect of reduced tillage on soil microbiota. **Ambio**, v. 51, n. 4, p. 1022–1033, 2022.

GALPERIN, M. Y. et al. COG database update: focus on microbial diversity, model organisms, and widespread pathogens. **Nucleic acids research**, v. 49, n. D1, p. D274–D281, 2021.

GELLIE, N. J. C. et al. Revegetation rewilds the soil bacterial microbiome of an old field. **Molecular ecology**, v. 26, n. 11, p. 2895–2904, 2017.

GUERRA, C. A. et al. Blind spots in global soil biodiversity and ecosystem function research. **Nature communications**, v. 11, n. 1, 2020.

GUO, X. et al. Effects of land use change on the composition of soil microbial communities in a managed subtropical forest. **Forest ecology and management**, v. 373, p. 93–99, 2016.

HACKL, E. et al. Composition of the microbial communities in the mineral soil under different types of natural forest. **Soil biology & biochemistry**, v. 37, n. 4, p. 661–671, 2005.

HANDELSMAN, J. et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & biology**, v. 5, n. 10, p. R245–R249, 1998.

HANIF, M. A. et al. Plant taxonomic diversity better explains soil fungal and bacterial diversity than functional diversity in restored forest ecosystems. **Plants**, v. 8, n. 11, p. 479, 2019.

HE, L. et al. Global biogeography of fungal and bacterial biomass carbon in topsoil. **Soil biology & biochemistry**, v. 151, n. 108024, p. 108024, 2020.

HII, Y. S. et al. Isolation and characterisation of phosphate solubilizing microorganisms from peat. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 26, n. 101643, p. 101643, 2020.

HUANG, C. et al. How is biodiversity changing in response to ecological restoration in terrestrial ecosystems? A meta-analysis in China. **The Science of the total environment**, v. 650, p. 1–9, 2019.

HUERTA-CEPAS, J. et al. eggNOG 5.0: a hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. **Nucleic acids research**, v. 47, n. D1, p. D309–D314, 2019.

HUGENHOLTZ, P.; TYSON, G. W. Metagenomics. **Nature**, v. 455, n. 7212, p. 481–483, 2008.

ISLAM, W. et al. Role of environmental factors in shaping the soil microbiome. **Environmental science and pollution research international**, v. 27, n. 33, p. 41225–41247, 2020.

- ISOBE, K. et al. Consequences of microbial diversity in forest nitrogen cycling: diverse ammonifiers and specialized ammonia oxidizers. **The ISME journal**, v. 14, n. 1, p. 12–25, 2020.
- JANGID, K. et al. Land-use history has a stronger impact on soil microbial community composition than aboveground vegetation and soil properties. **Soil biology & biochemistry**, v. 43, n. 10, p. 2184–2193, 2011.
- JOHNSTON, E. R. et al. Metagenomics reveals pervasive bacterial populations and reduced community diversity across the Alaska tundra ecosystem. **Frontiers in microbiology**, v. 7, 2016.
- KAPINUSOVA, G.; LOPEZ MARIN, M. A.; UHLIK, O. Reaching unreachables: Obstacles and successes of microbial cultivation and their reasons. **Frontiers in microbiology**, v. 14, 2023.
- KAVAMURA, V. N. et al. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological research**, v. 168, n. 4, p. 183–191, 2013.
- KUNIN, V. et al. A bioinformatician's guide to metagenomics. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 72, n. 4, p. 557–578, 2008.
- KUYPERS, M. M. M.; MARCHANT, H. K.; KARTAL, B. The microbial nitrogen-cycling network. **Nature reviews. Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 263–276, 2018.
- LAMMEL, D. R. et al. Specific microbial gene abundances and soil parameters contribute to C, N, and greenhouse gas process rates after land use change in Southern Amazonian Soils. **Frontiers in microbiology**, v. 6, 2015.
- LANGMEAD, B. et al. Scaling read aligners to hundreds of threads on general-purpose processors. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 35, n. 3, p. 421–432, 2019. Langmead, B., Wilks, C., Antonescu, V., & Charles, R. (2019).
- LAREEN, A.; BURTON, F.; SCHÄFER, P. Plant root-microbe communication in shaping root microbiomes. **Plant molecular biology**, v. 90, n. 6, p. 575–587, 2016.
- LAURETO, L. M. O.; CIANCIARUSO, M. V.; SAMIA, D. S. M. Functional diversity: an overview of its history and applicability. **Natureza & Conservação**, v. 13, n. 2, p. 112–116, 2015.
- LÓPEZ-ALADID, R. et al. Determining the most accurate 16S rRNA hypervariable region for taxonomic identification from respiratory samples. **Scientific reports**, v. 13, n. 1, 2023.
- LOUCA, S. et al. High taxonomic variability despite stable functional structure across microbial communities. **Nature ecology & evolution**, v. 1, n. 1, 2016.
- LOUCA, S. et al. Function and functional redundancy in microbial systems. **Nature ecology & evolution**, v. 2, n. 6, p. 936–943, 2018.
- LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome biology**, v. 15, n. 12, 2014.

- LU, J. et al. Metagenome analysis using the Kraken software suite. **Nature protocols**, v. 17, n. 12, p. 2815–2839, 2022.
- MENDIBURU, F. de; YASEEN, M. agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. R package version 1.4.0. 2020.
- MERLOTI, L. F. et al. Forest-to-agriculture conversion in Amazon drives soil microbial communities and N-cycle. **Soil biology & biochemistry**, v. 137, n. 107567, p. 107567, 2019.
- MORRISON, E. B.; LINDELL, C. A. Active or passive forest restoration? Assessing restoration alternatives with avian foraging behavior. **Restoration ecology**, v. 19, n. 201, p. 170–177, 2011.
- NANNIPIERI, P. et al. Microbial diversity and soil functions. **European journal of soil science**, v. 54, n. 4, p. 655–670, 2003.
- NIKITIN, D. A. et al. Microbiological indicators of soil ecological functions: A review. **Eurasian soil science**, v. 55, n. 2, p. 221–234, 2022.
- NURK, S. et al. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. **Genome research**, v. 27, n. 5, p. 824–834, 2017.
- OBIOL, A. et al. A metagenomic assessment of microbial eukaryotic diversity in the global ocean. **Molecular ecology resources**, v. 20, n. 3, p. 718–731, 2020.
- OKSANEN, J. Vegan: Community Ecology Package. R package version 2.6-0. 2024. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>. Acesso em: 10 dez. 2023.
- OVERBECK, G. E. et al. Placing Brazil's grasslands and savannas on the map of science and conservation. **Perspectives in plant ecology, evolution and systematics**, v. 56, n. 125687, p. 125687, 2022.
- Overbeck, Gerhard E., Toma, T. S. P., da Silveira-Filho, R. R., Dechoum, M. S., Fonsêca, N. C., Grelle, C. E. V., Guimarães, A. F., Negreiros, D., Nunes, A. V., Oliveira, H. F. M., Pereira, C. C., Perillo, L. N., Rocha, T. C., Rodrigues, D. J., Roque, F. O., Streit, H., Pillar, V. D., & Fernandes, G. W. (2024). **Brazil's natural grasslands under attack**. *Science* (New York, N.Y.), 384(6692), 168–169.
- PÉREZ-LOSADA, M. et al. Comparative analysis of metagenomics and metataxonomics for the characterization of vermicompost microbiomes. **Frontiers in microbiology**, v. 13, 2022.
- PHILIPPOT, L. et al. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature reviews. Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 789–799, 2013.
- Pyro, V. S., Roesch, L. F. W., Ortega, J. M., do Amaral, A. M., Tótola, M. R., Hirsch, P. R., Rosado, A. S., Góes-Neto, A., da Costa da Silva, A. L., Rosa, C. A., Morais, D. K., Andreote, F. D., Duarte, G. F., de Melo, I. S., Seldin, L., Lambais, M. R., Hungria, M., Peixoto, R. S., ... Azevedo, V. (2014). Brazilian microbiome project: Revealing the unexplored microbial diversity—challenges and prospects. **Microbial Ecology**, 67(2), 237–241.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic acids research**, v. 41, n. D1, p. D590–D596, 2012.

QUINCE, C. et al. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. **Nature biotechnology**, v. 35, n. 9, p. 833–844, 2017.

RASUL, M. et al. Phosphate solubilizers as antagonists for bacterial leaf blight with improved rice growth in phosphorus deficit soil. **Biological control: theory and applications in pest management**, v. 136, n. 103997, p. 103997, 2019.

RITTER, L. M. O.; RIBEIRO, M. C.; MORO, R. S. Composição florística e fitofisionomia de remanescentes disjuntos de Cerrado nos Campos Gerais, PR, Brasil - limite austral do bioma. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 3, p. 379–414, 2010.

ROMDHANE, S. et al. Land-use intensification differentially affects bacterial, fungal and protist communities and decreases microbiome network complexity. **Environmental microbiome**, v. 17, n. 1, 2022.

SEEMANN, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 30, n. 14, p. 2068–2069, 2014.

SINGH, J. S. Microbes: The chief ecological engineers in reinstating equilibrium in degraded ecosystems. **Agriculture, ecosystems & environment**, v. 203, p. 80–82, 2015.

SOKOL, N. W. et al. Life and death in the soil microbiome: how ecological processes influence biogeochemistry. **Nature reviews. Microbiology**, v. 20, n. 7, p. 415–430, 2022.

TAŞ, N. et al. Metagenomic tools in microbial ecology research. **Current opinion in biotechnology**, v. 67, p. 184–191, 2021.

TILMAN, D. **The Encyclopedia of Biodiversity**, v. 3, n. 0, p. 109–120, 2001.

TOOLE, D. R. et al. Bacterial functional prediction tools detect but underestimate metabolic diversity compared to shotgun metagenomics in southwest Florida soils. **Applied soil ecology: a section of Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 168, n. 104129, p. 104129, 2021.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current opinion in microbiology**, v. 5, n. 3, p. 240–245, 2002.

TRENTINI, C. P. et al. Thinning partially mitigates the impact of Atlantic forest replacement by pine monocultures on the soil microbiome. **Frontiers in microbiology**, v. 11, 2020.

TURNBAUGH, P. J. et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. **Nature**, v. 457, n. 7228, p. 480–484, 2009.

URBANOVÁ, M.; ŠNAJDR, J.; BALDRIAN, P. Composition of fungal and bacterial communities in forest litter and soil is largely determined by dominant trees. **Soil biology & biochemistry**, v. 84, p. 53–64, 2015.

VÉDÈRE, C. et al. Opportunities and limits in imaging microorganisms and their activities in soil microhabitats. **Soil biology & biochemistry**, v. 174, n. 108807, p. 108807, 2022.

VENTER, Z. S.; JACOBS, K.; HAWKINS, H.-J. The impact of crop rotation on soil microbial diversity: A meta-analysis. **Pedobiologia**, v. 59, n. 4, p. 215–223, 2016.

VAN CHUONG, N.; LE KIM TRI, T. Isolation and characterization identification of edaphytic nitrogen-fixing bacteria from peanut nodules. **International journal of microbiology**, v. 2024, n. 1, 2024.

VOS, M. et al. Micro-scale determinants of bacterial diversity in soil. **FEMS microbiology reviews**, v. 37, n. 6, p. 936–954, 2013.

WAGG, C. et al. Fungal-bacterial diversity and microbiome complexity predict ecosystem functioning. **Nature communications**, v. 10, n. 1, 2019.

WANG, C. et al. Ecological restoration treatments enhanced plant and soil microbial diversity in the degraded alpine steppe in Northern Tibet. **Land Degradation and Development**, v. 32, n. 2, p. 723–737, 2020.

WEMHEUER, F. et al. Tax4Fun2: prediction of habitat-specific functional profiles and functional redundancy based on 16S rRNA gene sequences. **Environmental microbiome**, v. 15, n. 1, 2020.

WICKHAM, Hadley. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Nova York: **Springer-Verlag**, 2016. ISBN 978-3-319-24277-4

WOOD, D. E.; LU, J.; LANGMEAD, B. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. **Genome biology**, v. 20, n. 1, 2019.

WOOD, D. E.; SALZBERG, S. L. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. **Genome biology**, v. 15, n. 3, 2014.

XIONG, C.; LU, Y. Microbiomes in agroecosystem: Diversity, function and assembly mechanisms. **Environmental microbiology reports**, v. 14, n. 6, p. 833–849, 2022.

YANG, Y. et al. Negative effects of multiple global change factors on soil microbial diversity. **Soil biology & biochemistry**, v. 156, n. 108229, p. 108229, 2021.

ZABEL, F. et al. Global impacts of future cropland expansion and intensification on agricultural markets and biodiversity. **Nature communications**, v. 10, n. 1, 2019.

ZHANG, L.; XU, Z. Assessing bacterial diversity in soil: A brief review. **Journal of soils and sediments**, v. 8, n. 6, p. 379–388, 2008.

ZHANG, X. et al. Metagenomic analysis reveals the effect of revegetation types on the function of soil microorganisms in carbon and nitrogen metabolism in the open-cast mining area. **Plant and soil**, v. 503, n. 1–2, p. 699–716, 2024.

ZOU, Y. et al. 1,520 reference genomes from cultivated human gut bacteria enable functional microbiome analyses. **Nature biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 179–185, 2019.