

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

LUÍS FELIPE GUANDALIN ZAGATTO

O *feedback* planta-solo e suas implicações na restauração ecológica na transição
Mata Atlântica-Cerrado

Piracicaba

2023

LUÍS FELIPE GUANDALIN ZAGATTO

O *feedback* planta-solo e suas implicações na restauração ecológica na transição
Mata Atlântica-Cerrado

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente.

Orientadora: Profa. Dra. Tsai Siu Mui

Piracicaba

2023

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Zagatto, Luís Felipe Guandalin

O *feedback* planta-solo e suas implicações na restauração ecológica na transição Mata Atlântica-Cerrado / Luís Felipe Guandalin Zagatto; Tsai Siu Mui. - - Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2023.

62 p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, 2023.

1. Arqueia 2. Bactérias 3. Ecologia de comunidades – Mata Atlântica 4. Ecologia microbiana 5. Ecossistemas de Cerrado 6. Fungos 7. Metagenoma 8. Microbiologia do solo 9. Qualidade do solo 10. Relação solo-planta I. Título

CDU 574.1 (631.461 + 579.26)

Elaborada por:

Marília Ribeiro Garcia Henyei

CRB-8/3631

Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 2017

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) por todas as oportunidades de crescimento pessoal e profissional oferecidas.

Ao corpo docente e aos demais funcionários e técnicos do CENA/PPG em Ciências que sempre estiveram dispostos a ajudar, proporcionando um ambiente agradável para a aprendizagem e estimulando a continuidade dos meus estudos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo n. 2021/10716-0.

Ao Jardim Botânico Municipal de Bauru pela autorização e recepção em todas as coletas de solo.

Aos colegas do Herbário UNBA (UNESP-Bauru) que auxiliaram durante as coletas de solo.

À minha orientadora, Profa. Dra. Tsai Siu Mui, pela orientação, pelas oportunidades oferecidas, pelos ensinamentos que vou levar por toda minha vida, pelas críticas e sugestões e, principalmente, pela amizade.

A todos os meus colegas de laboratório que, ao longo destes dois anos, me acompanharam, ensinaram e tornaram o período do mestrado muito mais tranquilo. Em especial, à Ana Vitória, Izadora, Gabriel, Anderson, Guilherme, Franciele, Jéssica, Deisi e Júlia.

Aos meus amigos de longa data Felipe, Caio, João Pedro, Gabriel e João Candido, que, mesmo à distância, sempre estiveram presentes.

Em especial, aos meus pais, Nilson e Helenice, minhas irmãs, Karla e Bruna, e minha companheira, Solange, que estiveram sempre presentes me apoiando, incentivando e dando muito carinho.

A todos aqueles que me auxiliaram de alguma forma nessa jornada.

RESUMO

ZAGATTO, L. F. G. **O *feedback* planta-solo e suas implicações na restauração ecológica na transição Mata Atlântica-Cerrado.** 2023. 62 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2023.

Em florestas, as árvores são as principais responsáveis por definir as interações que ocorrem acima e abaixo do solo. Por sua vez, o solo é um ecossistema complexo e vital que abriga uma vasta diversidade de organismos, que desempenham funções cruciais no ambiente, como a decomposição da matéria orgânica, a disponibilização de nutrientes e a formação de associações simbióticas com as plantas. As constantes interações entre as plantas e as características bióticas e abióticas do solo geram uma dinâmica de *feedback* planta-solo que tem papel fundamental na estruturação e manutenção das comunidades. Altamente degradada, a Mata Atlântica é a segunda maior floresta pluvial tropical do continente, existindo no estado de São Paulo diversas áreas de transição entre este bioma e o Cerrado que sofrem com ações antrópicas. Nos contextos atuais de mudanças climáticas e de degradação dos ecossistemas, muitas funções exercidas pela microbiota do solo estão sendo perdidas, o que tornam os esforços para sua recuperação essenciais para a sobrevivência dos biomas. Portanto, este trabalho teve como objetivo caracterizar a composição taxonômica, a diversidade e a estrutura de comunidades de microrganismos presentes em solos de uma área nativa de Mata Atlântica, uma de Cerrado e uma de transição Mata Atlântica-Cerrado (ecótono) no estado de São Paulo, bem como relacionar a estrutura dessas comunidades à características químicas e bioquímicas dos solos estudados. Para isso, amostras de solo coletadas em cada uma destas áreas e submetidas a diferentes análises: o DNA genômico total das amostras de solo foi extraído e submetido ao sequenciamento metagenômico do tipo *shotgun*; a atividade das enzimas extracelulares fosfatase ácida, fosfatase alcalina, beta-glicosidase e arilsulfatase foram avaliadas; e os parâmetros químicos (macro e micronutrientes, matéria orgânica e pH) e físicos (textura) do solo foram acessados. A partir deste estudo, foi possível observar que os solos das áreas de Mata Atlântica, ecótono e Cerrado diferiram em algumas propriedades químicas (pH do solo e quantidade de ferro, fósforo e manganês disponíveis) e bioquímicas (enzimas fosfatases ácida e alcalina), o que influenciou as comunidades microbianas. A estrutura das comunidades microbianas foi modulada pela diversidade beta, mesmo que não tenha havido diferenças quanto à diversidade alfa. A composição das comunidades microbianas e a abundância relativa foi semelhante para bactérias e fungos nos solos das três áreas, porém a abundância relativa de arqueias foi maior nos solos da área de Cerrado. Além disso, a comunidade de microrganismos do solo da área de Mata Atlântica se mostrou mais complexa e resiliente do que a comunidade presente no solo da área de Cerrado. Portanto, os resultados deste estudo fornecem ideias sobre como a estrutura das comunidades microbianas diferem ao longo de um gradiente de vegetação entre a Mata Atlântica e o Cerrado, indicando que as comunidades microbianas presentes no solo de Cerrado estudado são menos resilientes, estando mais suscetíveis a distúrbios, o que pode impactar a comunidade vegetal presente acima do solo.

Palavras-chave: Ecótono. Microbioma. Biodiversidade. Metagenoma. Estrutura da comunidade.

ABSTRACT

ZAGATTO, L. F. G. **Plant-soil feedback and its implications for ecological restoration in the Atlantic Forest-Cerrado transition.** 2023. 62 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2023.

In forests, trees are the main responsible for defining interactions that occur above and below ground. The soil is a complex and vital ecosystem that harbors a vast diversity of organisms, which perform crucial functions in the environment, such as decomposition of organic matter, nutrient availability, and formation of symbiotic associations with plants. Thus, constant interactions between plants and biotic and abiotic soil characteristics generate a plant-soil feedback dynamic that plays a fundamental role in structuring and maintaining communities. Highly degraded, the Atlantic Forest is the second largest tropical rainforest on the American continent, with several transition areas between this biome and the Cerrado in the state of São Paulo suffering from anthropogenic actions. In the current context of climate change and ecosystem degradation, many of the functions performed by soil microbiota are being lost, making efforts for their recovery essential for the survival of these biomes. Therefore, this work aimed to characterize the taxonomic composition, diversity, and structure of microbial communities present in soils of a native Atlantic Forest area, a transition zone (ecotone), and a Cerrado area in the state of São Paulo, as well as to relate the structure of these communities to chemical and biochemical soil characteristics. For this purpose, soil samples collected from each of these areas were subjected to different analyses: total genomic DNA from soil samples was extracted and subjected to shotgun metagenomic sequencing; extracellular enzyme activities, including acid phosphatase, alkaline phosphatase, beta-glucosidase, and arylsulfatase, were evaluated; and soil chemical (macro and micronutrients, organic matter, and pH) and physical (texture) parameters were assessed. The results indicate that the soils from the Atlantic Forest, ecotone, and Cerrado areas differed in some chemical (soil pH and available iron, phosphorus, and manganese) and biochemical (acid and alkaline phosphatase enzyme activities) properties, which influenced microbial communities. Additionally, microbial community structure was modulated by beta diversity, even though there were no differences in alpha diversity. Microbial community composition and relative abundance were similar for bacteria and fungi in soils from all three areas, but the relative abundance of archaea was higher in soils from the Cerrado area. Moreover, the soil microbial community in the Atlantic Forest area was more complex and resilient than the community present in the Cerrado area. The results of this study provide insights into how microbial community structure differs along a vegetation gradient between the Atlantic Forest and the Cerrado, indicating that microbial communities present in the studied Cerrado soil are less resilient, making them more susceptible to disturbances that can impact the plant community present above ground.

Keywords: Ecotone. Microbiome. Biodiversity. Metagenome. Community structure.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. O solo como um habitat biodiverso e essencial para a sustentação da vida no planeta	11
1.2. Mata Atlântica e Cerrado: biomas-chave para a conservação da biodiversidade brasileira	12
1.3. O <i>feedback</i> planta-solo e as interações biológicas	14
1.4. Conhecer para conservar ou restaurar: a caracterização da microbiota e suas interações com o solo em área de transição Mata Atlântica-Cerradão	15
2. HIPÓTESES	17
3. OBJETIVOS	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1. Caracterização das áreas de estudo	19
4.2. Coleta do solo	21
4.3. Análises físico-químicas e de atividade enzimática dos solos	22
4.4. Extração de DNA e sequenciamento metagenômico	23
4.5. Anotação de dados metagenômicos	23
4.6. PCR quantitativa (qPCR)	24
4.7. Análises estatísticas e de bioinformática	25
5. RESULTADOS	27
5.1. Características físico-químicas do solo e atividade enzimática	27
5.2. Composição e diversidade da comunidade microbiana	30
5.3. Estrutura da comunidade microbiana	34
5.4. Potencial perfil funcional das comunidades de microrganismos do solo	41
6. DISCUSSÃO	42
6.1. Características físico-químicas do solo e atividade enzimática	42
6.2. Composição e diversidade da comunidade microbiana	43
6.3. Estrutura da comunidade microbiana	46
6.4. Potencial perfil funcional das comunidades de microrganismos do solo	48
7. CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS	50

1. INTRODUÇÃO

1.1. O solo como um habitat biodiverso e essencial para a sustentação da vida no planeta

O solo consiste em um ecossistema complexo e vital que abriga uma vasta diversidade de organismos, sustentando toda a fauna, flora e fungos terrestres. Estima-se que um grama de solo possa conter de 2000 a 18000 diferentes genomas, muitos dos quais pertencentes a espécies ainda desconhecidas (WALL *et al.*, 2019; XU *et al.*, 2014). O desenvolvimento de técnicas de sequenciamento metagenômico de DNA permitiu o acesso a espécies microbianas do solo não cultiváveis, abrindo várias novas oportunidades para explorar diferentes dados taxonômicos e funcionais (FIERER *et al.*, 2012; SAHEB; KASHAF *et al.*, 2021; VESTERGAARD *et al.*, 2017). Essa nova abordagem tornou possível compreender de forma mais precisa questões como quais microrganismos estão presentes em ambientes, quais funções essas espécies podem desempenhar, quais interações ocorrem em diferentes habitats e como essas comunidades respondem a mudanças no uso da terra (NESME *et al.*, 2016).

Além de sustentar as comunidades microbianas, o solo é responsável pela ciclagem de nutrientes e por transformar a matéria, regulando a qualidade do ar e da água (JANSSON; HOFMOCKEL, 2018; WALL *et al.*, 2019). Esses e outros serviços ecossistêmicos promovidos pelo solo são determinados por fatores abióticos, como propriedades químicas e fatores climáticos, que moldam os fatores bióticos, como a microbiota, resultando em processos fundamentais para a sustentação da vida no planeta (WALL *et al.*, 2019).

Além de suas propriedades físicas e químicas, o solo tem sua porção biológica composta por bactérias, arqueias, fungos, vírus, cianobactérias, protistas, outros microrganismos e representantes da macro e microfauna. As comunidades microbianas, apesar de constituírem menos de 5% da matéria orgânica do solo, desempenham funções cruciais no ambiente, como a decomposição da matéria orgânica morta, a disponibilização de carbono, nitrogênio e fósforo para a cadeia trófica, a formação de associações simbióticas com as plantas, a agregação de partículas e a participação na formação estrutural do solo (DALAL, 1998; WALL *et al.*, 2019; FIERER; WOOD; BUENO DE MESQUITA, 2021). A diversidade taxonômica e funcional da microbiota é um importante indicador de saúde do solo. Outras métricas relacionadas aos microrganismos, como as atividades de enzimas extracelulares, que atuam diretamente nos ciclos do carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre, também podem ser utilizadas como indicadores da saúde do solo (FIERER; WOOD; BUENO DE MESQUITA, 2021). Portanto,

nos contextos atuais de mudanças climáticas, expansão agrícola desordenada e degradação do solo, muitas funções essenciais exercidas pela microbiota do solo estão sendo alteradas ou perdidas, o que torna a sua conservação ou recuperação essencial para a sobrevivência e manutenção dos ecossistemas (ALVES *et al.*, 2020; JANSSON; HOFMOCKEL, 2018; WALL *et al.*, 2019).

1.2. Mata Atlântica e Cerrado: biomas-chave para a conservação da biodiversidade brasileira

Considerada a segunda maior floresta tropical pluvial do continente americano, a Mata Atlântica abrange uma grande diversidade de zonas climáticas e formações vegetais (REZENDE *et al.*, 2018; TABARELLI *et al.*, 2005). Originalmente, recobria de forma contínua a costa brasileira, adentrando o continente em algumas regiões, estendendo-se ao Paraguai e Argentina (TABARELLI *et al.*, 2005). Atualmente, distribui-se por 17 estados brasileiros e abriga grande parte dos maiores polos industriais, químicos, petroleiros, portuários e turísticos do país. Entretanto, a ação antrópica desde a colonização, com intensos processos de urbanização e expansão agrícola nas regiões de ocupação da Mata Atlântica, resultou em uma grande perda de biodiversidade (JOLY; METZGER; TABARELLI, 2014; CAMPANILI; SCHAFFER, 2010). Atualmente, a Mata Atlântica apresenta apenas 12% de sua área original recoberta, com áreas muitas vezes fragmentadas em pequenos trechos florestais isolados (JOLY; METZGER; TABARELLI, 2014; TABARELLI *et al.*, 2005).

O Cerrado, por sua vez, é o segundo maior bioma brasileiro, ocupando cerca de 21% do território nacional (KLINK; MACHADO, 2005). Também altamente degradado e sob constantes pressões antrópicas (STRASSBURG *et al.*, 2017), os solos de Cerrado são, de modo geral, ácidos, pobres em nutrientes e ricos em alumínio (KLINK; MACHADO, 2005; PY-DANIEL, 2010), características que conferem ao bioma uma grande diversidade biológica, com variações no tipo de vegetação encontrada. Segundo Coutinho (1978), o Cerrado apresenta cinco fitofisionomias, compostas por campos abertos, por formações savânicas intermediárias, e pelo cerradão, que é caracterizado pela alta densidade e diversidade de espécies arbóreas e baixa densidade de espécies herbáceas, apresentando fisionomia florestal.

Devido ao alto grau de degradação, de endemismo e alta diversidade biológica, os biomas Mata Atlântica e Cerrado são considerados parte dos 25 *hotspots* mundiais de biodiversidade, sendo áreas-chave prioritárias para conservação (MYERS *et al.*, 2000). No estado de São Paulo, fragmentos florestais remanescentes compreendem cerca de 32,6% da área

original coberta por vegetação de Mata Atlântica (67,3%) e 3% da área original coberta por vegetação de Cerrado (32,6%) (SÃO PAULO, 2020) (Figura 1).

Figura 1 - Representação das áreas originais de ocorrência e a vegetação remanescente de Mata Atlântica e Cerrado no estado de São Paulo.



Fonte: São Paulo (2020).

No centro-oeste paulista, a região administrativa de Bauru apresenta poucos fragmentos maiores do que 100 hectares (SÃO PAULO, 2005). Um deles está localizado na Gleba II do Refúgio de Vida Silvestre Aimorés, que apresenta 277 hectares ocupados por cerradão e 5 hectares ocupados por floresta estacional semidecídua, uma das fitofisionomias de Mata Atlântica (WEISER, 2007). Os limites entre essas fisionomias não são definidos e formam grandes áreas de transição em que espécies características dos dois biomas se misturam (WEISER, 2007). Essa mudança gradual na comunidade em uma distância relativamente curta caracteriza uma área de transição, também chamada de ecótono (RICKLEFS; RELYEA, 2016).

1.3. O *feedback* planta-solo e as interações biológicas

Em formações florestais, as espécies arbóreas são as principais responsáveis por definir as interações que ocorrem acima e abaixo do solo, bem como atuam como as principais determinantes do microbioma, requerendo interações com microrganismos simbiotes para processos fundamentais, como a mobilização de componentes minerais e a produção de exsudatos pela raiz (URBANOVA; ŠNAJDR; BALDRIAN, 2015; BALDRIAN, 2017). Assim, o predomínio de espécies arbóreas encontrado na Mata Atlântica e no cerrado, entre outros fatores, está relacionado às características físicas, químicas e biológicas do solo, fundamentais para o sucesso de diferentes espécies vegetais e pela coexistência que dá origem às comunidades (BENNET; KLIRONOMOS, 2019; VAN DER PUTTEN *et al.*, 2013). Por outro lado, as plantas influenciam propriedades bióticas e abióticas do solo através de fatores como a regulação da temperatura e o fornecimento de habitats para diferentes espécies, tanto acima quanto abaixo do solo (DE LONG *et al.*, 2019; VAN DER PUTTEN *et al.*, 2016). Através da deposição de serrapilheira (biomassa vegetal morta presente sobre o solo que é composta principalmente por biopolímeros da parede celular vegetal, como celulose, hemicelulose e lignina) as espécies vegetais fornecem a maior fonte de matéria orgânica acumulada sobre o solo, que suporta comunidades de organismos capazes de decompor compostos celulares vegetais e devolver componentes minerais e orgânicos ao ambiente (MOORHEAD; SINSABAUGH, 2006; BARLOW *et al.*, 2007; NDAW *et al.*, 2009; ŠTURSOVÁ *et al.*, 2012; PRESCOTT; GRAYSTON, 2013; URBANOVA; ŠNAJDR; BALDRIAN, 2015; BALDRIAN, 2017; MAŠÍNOVÁ *et al.*, 2017). Todas essas alterações causadas no solo pelas plantas e o impacto que o solo tem, a partir disso, para as espécies vegetais, são definidas como *feedback* planta-solo (*plant-soil feedback*, PSF) (VAN DER PUTTEN *et al.*, 2013; VAN DER PUTTEN *et al.*, 2016).

A heterogeneidade encontrada em solos de florestas influencia diretamente a composição das comunidades microbianas, que são afetadas tanto por fatores genéticos das espécies vegetais quanto por fatores ambientais, como características da serrapilheira, matéria orgânica, valores de pH e de nutrientes presentes no solo (BALDRIAN, 2017). Todos esses fatores são dinâmicos, fazendo com os componentes presentes no ambiente variem temporalmente (BALDRIAN, 2017). Existem evidências na literatura que as comunidades de fungos, bactérias e outros microrganismos encontrados na serrapilheira são diferentes daquelas presentes no solo, com ambas exercendo funções distintas (ŠTURSOVÁ *et al.*, 2012; URBANOVA; ŠNAJDR; BALDRIAN, 2015). Em ambientes tropicais de solos mais pobres,

os microrganismos associados à serrapilheira atuam como maior fonte de carbono e nitrogênio do que aqueles presentes no solo, sendo, assim, essenciais para a manutenção dos ambientes (NDAW *et al.*, 2009). Ao longo do processo de decomposição, a qualidade da serrapilheira muda, fazendo com que componentes como o carbono deixem de estar facilmente disponíveis, o que influencia diretamente as comunidades microbianas associadas (DILLY *et al.*, 2004). Assim, ao longo do tempo o PSF pode variar de positivo (quando melhora as condições para coespecíficos, aumentando a probabilidade de a espécie colonizar o local) a negativo (quando atua no solo de modo a torná-lo menos favorável a coespecíficos, aumentando a probabilidade de que a espécie seja substituída por outras mais aptas às condições locais) (BENNET; KLIRONOMOS, 2019; VAN DER PUTTEN *et al.*, 2013). Portanto, diferentes ambientes suportam comunidades distintas de microrganismos e, conseqüentemente, geram PSF desiguais.

1.4. Conhecer para conservar ou restaurar: a caracterização da microbiota e suas interações com o solo em área de transição Mata Atlântica-Cerradão

O PSF tem um papel fundamental no funcionamento dos ecossistemas e na estruturação das comunidades, guiando, inclusive, processos atuantes na restauração ecológica (DE LONG *et al.*, 2019). Quando consideramos o atual cenário de mudanças climáticas, de destruição de habitats e de manejo inadequado dos ambientes, no qual a Organização das Nações Unidas (ONU) definiu o período de 2021-2030 como a Década da Restauração de Ecossistemas (UNITED NATIONS, 2019), conhecer os impactos que as espécies presentes acima e abaixo do solo exercem umas sobre as outras é essencial para que possamos empregar medidas de recuperação de áreas degradadas. Ainda, em busca na literatura, é possível notar que são escassos os trabalhos que avaliam as interações da microbiota em áreas de transição entre Mata Atlântica e Cerrado. Ademais, são poucos os estudos que analisam a microbiota do solo e o PSF em áreas de cerradão (ARAUJO *et al.*, 2017; 2018a; 2018b), dos quais nenhum avalia locais no estado de São Paulo.

Assim, considerando que os micro-organismos do solo desempenham um papel fundamental nas relações que ocorrem acima e abaixo do solo e que, em regiões tropicais, essas características foram pouco estudadas (GUERRA *et al.*, 2020; VENTURINI *et al.*, 2022), a falta de atenção a esses biomas pode levar os tomadores de decisão a não priorizar áreas para conservação ou o desenvolvimento de projetos de restauração ecológica que não terão sucesso em manter ou recuperar serviços ecossistêmicos (CAMERON *et al.*, 2018;

GUERRA *et al.*, 2020). Além disso, muitas espécies microbianas ainda desconhecidas podem possuir genes com potencial biotecnológico, podendo ser utilizados no desenvolvimento de medicamentos ou ter outras aplicações industriais (DELMONT *et al.*, 2011). Assim, levando em conta sua importância para a biodiversidade, possivelmente para aplicações biotecnológicas e sua rápida substituição por ações antrópicas, é fundamental que sejam realizados esforços para a caracterização da microbiota do solo em áreas de Mata Atlântica, de Cerrado e de transição entre estes biomas, bem como o entendimento de possíveis implicações destas em projetos conservação e de restauração ecológica.

2. HIPÓTESES

As hipóteses deste estudo são de que:

- a) as comunidades de microrganismos presentes nos solos de uma área de Mata Atlântica, uma de transição (ecótono) e uma de Cerrado apresentarão composições distintas, com a microbiota do solo da área onde predominam espécies de Mata Atlântica apresentando maior diversidade funcional e taxonômica devido à maior umidade, maior deposição de serrapilheira e maior acúmulo de matéria orgânica;
- b) as características químicas e a atividade de enzimas extracelulares presentes nos solos diferem entre os solos da área de Mata Atlântica, de Cerrado, e da área de transição entre estes dois biomas (ecótono), tendo relação com as comunidades de microrganismos presentes no solo.

3. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo geral avaliar e caracterizar a microbiota do solo de uma área de Mata Atlântica, de transição (ecótono) e de Cerrado com fisionomia florestal (cerradão) no centro-oeste do estado de São Paulo. Os objetivos específicos deste estudo são:

- a) caracterizar e avaliar a diversidade taxonômica e funcional da microbiota solo em três áreas de vegetação nativa: uma em que predominam espécies vegetais especialistas de Mata Atlântica, uma em que predominam espécies vegetais especialistas de Cerrado e uma em que predominam espécies vegetais generalistas;
- b) caracterizar parâmetros químicos (macro e micronutrientes, matéria orgânica e pH), bioquímicos (atividade de enzimas extracelulares presentes no solo) e físicos (granulometria) dos solos, e os relacionar à composição e à estrutura das comunidades microbianas presentes nos solos das três áreas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Caracterização das áreas de estudo

A amostragem dos solos foi realizada no município de Bauru, centro-oeste do estado de São Paulo, no sudeste do Brasil, nas coordenadas (22°19'41" a 22°21'06"S e 48°59'49" a 49°01'12"W) (WEISER, 2007) e altitude com variação de 519 a 603 metros (SFAIR *et al.*, 2010). O clima do município de Bauru é o Cwa de Koeppen (1948), caracterizado por temperaturas altas com uma estação fria e seca muito curta em julho e agosto, e outra quente e chuvosa de setembro a junho (WEISER, 2007).

A área de coleta está localizada na Gleba II do Refúgio de Vida Silvestre Aimorés, que apresenta 308,068 hectares e está situada na região sudeste de Bauru (Figura 2). Este fragmento apresenta 277 hectares de vegetação florestal de Cerrado e 5 hectares de floresta estacional semidecídua sem limites claramente definidos (WEISER, 2007), caracterizando, assim, um ecótono Mata Atlântica-Cerrado. No sudoeste da Gleba II do Refúgio de Vida Silvestre Aimorés foram estabelecidas aleatoriamente por Weiser (2007) 100 parcelas de 10m x 10m, delimitadas com auxílio de estacas e corda, resultando em um hectare descontínuo de parcelas permanentes. O método utilizado foi o de aleatorização irrestrita, que consiste na delimitação de dois eixos ortogonais ideais e sorteio das coordenadas aleatórias para localizar as parcelas (GREIG-SMITH, 1983). Nestas 100 parcelas, Weiser (2007) realizou o levantamento florístico de todas as espécies arbustivas, arbóreas e trepadeiras, registrando um total de 14208 indivíduos, pertencentes a 192 espécies. Em levantamento fitossociológico realizado na área entre os anos de 2017 e 2019, Francisco (2020) classificou a comunidade arbórea como altamente dinâmica, indicando que, atualmente, existe a tendência de substituição de espécies especialistas de Cerrado por espécies especialistas de Mata Atlântica ou generalistas.

Para delimitar em quais parcelas os solos seriam coletados, foram analisados os dados florísticos amostrados por Weiser (2007) e classificados todos os indivíduos arbustivos e arbóreos presentes nas parcelas como especialistas de Mata Atlântica, de Cerrado ou como generalistas (ou seja, que ocorrem em ambos os biomas) segundo Durigan *et al.* (2004) e Oliveira (2008). A partir da divisão dos indivíduos, as 100 parcelas permanentes foram classificadas como pertencentes a três classes: parcelas onde predominam indivíduos de espécies especialistas de Mata Atlântica, parcelas onde predominam indivíduos de espécies especialistas de Cerrado e parcelas onde predominam indivíduos de espécies generalistas. Nesta

classificação, foram identificadas 45 parcelas dominadas por indivíduos de espécies generalistas, 50 parcelas com predomínio de indivíduos de espécies especialistas de Cerrado e apenas três parcelas com preponderância de indivíduos de espécies especialistas de Mata Atlântica, estando estas últimas localizadas próximas umas às outras. Além disso, foi observado que duas das 100 parcelas apresentam porcentagens iguais entre indivíduos de Cerrado e generalistas.

Figura 2 - Mosaico de Unidades de Conservação do Cerrado Paulista localizados nos municípios de Agudos, Bauru e Pederneiras no estado de São Paulo, indicando as glebas da Área de Relevante Interesse Ecológico Leopoldo Magno Coutinho em amarelo e as glebas do Refúgio de Vida Silvestre Aimorés em verde.



A Gleba II do Refúgio de Vida Silvestre Aimorés está destacada em vermelho. Fonte: São Paulo (2018).

Tendo em vista a classificação das 100 parcelas permanentes em diferentes classes de vegetação, selecionamos três parcelas para a coleta das amostras necessárias para o estudo: uma onde mais de 90% dos indivíduos de plantas são especialistas de Mata Atlântica, uma onde mais de 90% dos indivíduos de plantas são especialistas de Cerrado e uma onde mais de 90% dos indivíduos de plantas são generalistas (Figura 3).

Figura 3 – Parcelas selecionadas para a coleta das amostras de solo utilizadas para as diferentes análises neste estudo.

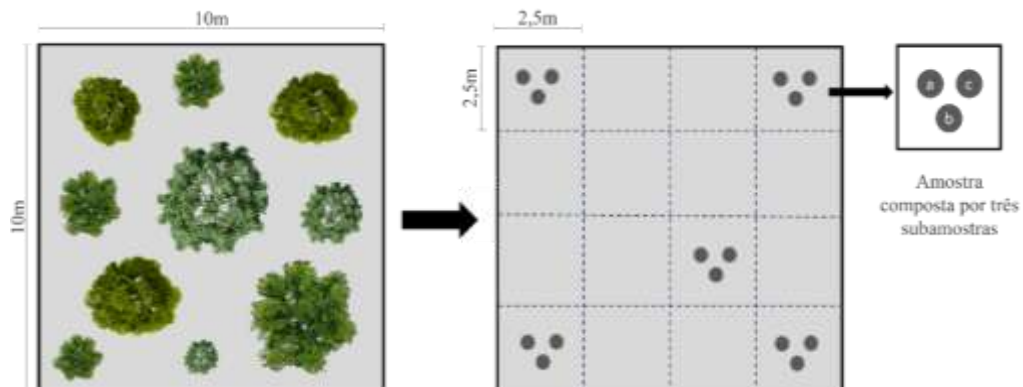


É possível observar que, considerando as características das vegetações especialistas de cada bioma ou generalistas, as parcelas não possuem somente diferenças em relação às espécies de plantas presentes, mas também são visualmente distintas. Fonte: autoria própria.

4.2. Coleta do solo

Em novembro de 2021, visando uma amostragem representativa da área total das parcelas, estas foram divididas em 16 subparcelas de 2,5m² cada. Então, nas subparcelas localizadas nos cantos e em uma próxima ao centro o solo foi coletado (Figura 4).

Figura 4 - Representação de como o solo foi amostrado nas parcelas localizadas em área de Mata Atlântica, de ecótono e de Cerrado.



Fonte: autoria própria.

Nestes pontos de amostragem, a camada de serrapilheira foi removida e três amostras de solo foram coletadas em duas profundidades diferentes (0-10 cm e 10-20 cm) e, para cada profundidade, foram misturadas, formando uma amostra composta. Portanto, para cada uma das áreas, foram obtidos cinco pontos de amostragem em profundidade de 0-10cm e cinco em profundidade de 10-20cm. As amostras compostas incluíram (i) um núcleo de solo não perturbado para determinação das propriedades físicas do solo, (ii) 50g de solo, manipulado com técnicas estéreis para análise molecular, (iii) 500g de solo para análise química, e (iv) 500g de solo para análises enzimáticas. As amostras de solo foram transportadas para o Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP, Piracicaba, Brasil) em gelo. As amostras para análises moleculares foram armazenadas a -20 °C, enquanto as amostras para análises físico-químicas e de atividade enzimática foram armazenadas a 4 °C.

4.3. Análises físico-químicas e de atividade enzimática dos solos

Os atributos químicos foram analisados com base nas diretrizes do Manual de Análise Química para Avaliação da Fertilidade de Solos Tropicais (van RAIJ., 2001). Os parâmetros avaliados foram a quantidade de matéria orgânica (oxidação), pH (CaCl₂), fósforo (resina), potássio (resina), cálcio (resina), magnésio (resina), alumínio (KCl), enxofre (fosfato de cálcio), boro (água quente), cobre (DTPA), ferro (DTPA), manganês (DTPA) e zinco (DTPA). As análises físicas foram conduzidas seguindo o Manual de Métodos de Análise de Solo (TEIXEIRA *et al.*, 2017). O parâmetro analisado foi a granulometria (areia, silte e argila) dos solos, utilizando-se a metodologia da pipeta. Todos os atributos químicos e físicos do solo foram analisados em laboratório especializado (Laboratório de Análises Agrícolas e Ambientais – Agrilab, Botucatu-SP).

Para as análises de atividade de enzimas extracelulares, as amostras de solo foram homogeneizadas e peneiradas em uma malha com abertura de 4 mm. Após, a umidade das amostras foi determinada pelo método gravimétrico. A atividade das enzimas extracelulares fosfatase ácida, fosfatase alcalina e arilsulfatase foi determinada conforme metodologia descrita por Tabatabai (1994). Para as fosfatases ácida e alcalina, foi utilizado o substrato ρ -nitrofenil fosfato de sódio, juntamente com um tampão universal modificado (MUB) (pH 5,5 para a fosfatase ácida e pH 11,0 para a fosfatase alcalina). Após a incubação por 1h a 37 °C, o produto da hidrólise foi aferido em espectrofotômetro a 400 nm. Já para a arilsulfatase, as amostras de solo foram incubadas a 37 °C por uma hora com o substrato ρ -nitrofenil sulfato de potássio, e

o produto de hidrólise foi lido em espectrofotômetro a 400 nm. A atividade da enzima β -Glicosidase foi avaliada de acordo com a metodologia proposta por Eivazi e Tabatabai (1988), empregando-se o p -nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo como substrato e realizando-se a determinação colorimétrica a 410 nm.

4.4. Extração de DNA e sequenciamento metagenômico

O DNA total presente nas amostras de solo foi extraído usando o kit DNeasy PowerLyzer PowerSoil (Qiagen, Hilden, Alemanha) com modificações propostas para solos tropicais (VENTURINI *et al.*, 2020). A qualidade e concentração do DNA foram medidas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) e eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed™ (BIOTIUM) em solução tampão TSB (*Sodium Borate Buffer*) (BRODY; KERN, 2004). Todas as amostras de DNA foram submetidas a sequenciamento metagenômico do tipo *shotgun* na NGS Soluções Genômicas (Piracicaba, Brasil), em plataforma Illumina NovaSeq 6000 (2x150bp) (Illumina Inc., San Diego, CA, EUA). O DNA extraído foi utilizado para as análises de PCR quantitativa em tempo real.

4.5. Anotação de dados metagenômicos

As sequências *paired-end* geradas pelo sequenciamento metagenômico do tipo *shotgun* foram primeiramente montadas usando a ferramenta PEAR (ZHANG *et al.*, 2014), incorporando ambas as sequências *forward* e *reverse*, bem como quaisquer leituras da sequência *forward* não mescladas. Sequências com qualidade inferior a Q30 foram subsequentemente removidas. As sequências *paired-end* de DNA foram então anotadas usando a *pipeline* do *Metagenomics Rapid Annotation Server* (MG-RAST) (MEYER *et al.*, 2008) e classificadas em OTUs. Os perfis taxonômicos e funcionais potenciais das sequências foram determinados usando os bancos de dados para genomas completos RefSeq (O'LEARY *et al.*, 2016) e o banco de dados SEED Subsystems (OVERBEEK *et al.*, 2005), respectivamente. As matrizes de dados geradas a partir deste processo foram posteriormente curadas para manualmente deixar apenas sequências anotadas como de bactérias, de arqueias e de fungos.

4.6. PCR quantitativa (qPCR)

A técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) foi utilizada para quantificar arqueias, bactérias e fungos, a partir do gene 16S rRNA e da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*). O cálculo do número de cópias foi realizado com base na curva padrão diluída entre 10^{10} a 10^1 cópias do gene de interesse, obtido previamente pela técnica de PCR a partir de um pool de amostras ambientais e submetidas à amplificação em PCR convencional, utilizando as mesmas condições de suas respectivas qPCR, com exceção do mix de reagentes, onde foi utilizado 2.5µL de 10x buffer, 2µL de MgCl₂ 50mM, 0.25 de dNTPs 10nM e 0.25µL de *bovine serum albumin* (BSA) 1% (Thermo Fisher Scientific, EUA), 1µL de cada primer, 0.2µL de Platinum Taq (Thermo Fisher Scientific, EUA) e 1µL de DNA, completando com água ultrapura até um volume final de 20µL da reação. Posteriormente, as amostras amplificadas foram purificadas utilizando o kit de purificação de DNA e banda de gel GFX™ PCR (GE Healthcare, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Para confirmar a presença do gene de interesse, as amostras foram submetidas a uma eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando um marcador 1kb, baseado no marcador e no tamanho esperado dos *amplicons*. A técnica de qPCR foi realizada em triplicata para cada amostra no equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems), com um volume final de 10 µL, contendo 5 µL de PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific), 0.2 µL de BSA (Thermo Fisher Scientific Inc., 20 mg ml⁻¹) 1 µL de cada primer (5 pmols) (Tabela 1), 1 µL de DNA (10 ng/µL) e 1.8 µL de água ultrapura estéril, e os ciclos de reação seguiram os protocolos estabelecidos nos trabalhos de referência dos primers utilizados (Tabela 1). Os dados de abundância de cada amostra foram transformados em número de cópias por µL de DNA.

Tabela 1 - Genes e primers utilizados nas análises de PCR quantitativa (qPCR)

Gene	Grupo alvo	Primers	Sequência (5' – 3')	Referência
Região V4 do rRNA 16S SSU	Bactérias	515F	GTGYCAGCMGCCGCGGT AA	Parada <i>et al.</i> (2016)
		806R	GGACTACNVGGGTWTCT AAT	Apprill <i>et al.</i> (2015)
	Arqueias	519F	CAGCCGCCGCGGTAA	Klindworth <i>et al.</i> (2012)
ITS	Fungos	915R	GTGCTCCCCCGCCAATTC CT	Stahl; Amman (1991)
		ITS1f	AATGATACGGCGACCACC GAGATCTACACGGCTTGG TCATTTAGAGGAAGTAA	White <i>et al.</i> (1990)
		ITS2	CAAGCAGAAGACGGCAT ACGAGATNNNNNNNNNN CGGCTGCGTTCTTCATCG ATGC	

Fonte: autoria própria.

4.7. Análises estatísticas e de bioinformática

Todas as análises estatísticas e de bioinformática foram realizadas no ambiente R (versão 4.2), utilizando o *software* RStudio (version 2022.2.3.492) (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2022). Todas as análises referentes às comunidades microbianas (contidas nas matrizes de perfil taxonômico e perfil funcional potencial geradas pelo MG-RAST) presentes nas amostras de solo foram realizadas utilizando-se o pacote *microeco* (CHI LIU *et al.*, 2021).

Os parâmetros físicos, químicos e a atividade enzimática dos solos foram analisados utilizando o *software* R. Os dados foram avaliados quanto à normalidade (usando o teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (usando o teste de Levene) antes da análise estatística. As comparações entre os solos das diferentes áreas e profundidades foram realizadas através do teste de Kruskal-Wallis para comparações múltiplas, seguido do teste de Dunn ($p < 0.05$).

Para a diversidade alfa, uma medida da diversidade dentro de uma amostra, os dados foram rarefados para o tamanho mínimo da biblioteca e a diversidade observada foi calculada. As diferenças entre as áreas e profundidades foram avaliadas a partir do teste de Kruskal-Wallis, com correções utilizando a razão de falsas descobertas de Benjamini-Hochberg. A diversidade

beta foi usada para avaliar as diferenças no microbioma entre as amostras. Os dados foram ordenados utilizando a distância Euclidiana e os componentes principais (PCoA) foram plotados em dois eixos. As diferenças estatísticas entre os índices de diversidade beta foram determinadas usando a análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA).

Os principais fatores ambientais influenciando as diferenças entre as comunidades foram identificados usando a análise de redundância baseada em distância (dbRDA) a partir de matrizes de dissimilaridade Bray-Curtis. O *forward selection* (FS) e os testes de permutação de Monte Carlo foram aplicados com 1000 permutações aleatórias para verificar a significância das influências das propriedades físicas, químicas e bioquímicas do solo nas comunidades microbianas. O gráfico referente a análise de dbRDA foi gerado no *software* Canoco 5.0 (Biometrics, Wageningen, The Netherlands).

O número relativo de cópias dos genes 16S e ITS foram comparados a partir de análises de variância (ANOVA – $p < 0.05$). Para as análises de dissimilaridade, transformamos o conjunto de dados por uma razão logarítmica centralizada (*centered log-ratio*, CLR), visando refletir a estrutura composicional dos dados (GLOOR *et al.*, 2017). Para avaliar as abundâncias diferenciais entre as áreas, foi utilizado o método ALDEx2 (FERNANDES *et al.*, 2013). Tendo em vista que este método avalia as diferenças de abundâncias levando em conta falsos-positivos e fatores aleatórios que podem ocorrer na amostragem do DNA extraído e carregado na plataforma de sequenciamento, este método é amplamente indicado para análises de dados composicionais de comunidades microbianas (GLOOR *et al.*, 2016; GLOOR *et al.*, 2017). Consideramos os gêneros diferencialmente abundantes aqueles com tamanho de efeito maior que um e valor de p calculado pelo teste T de Welch menor do que 0.05 (GLOOR *et al.*, 2016). Os gráficos referentes aos resultados gerados pelo método ALDEx2 foram construídos utilizando-se o *software* STAMP (PARKS *et al.*, 2014).

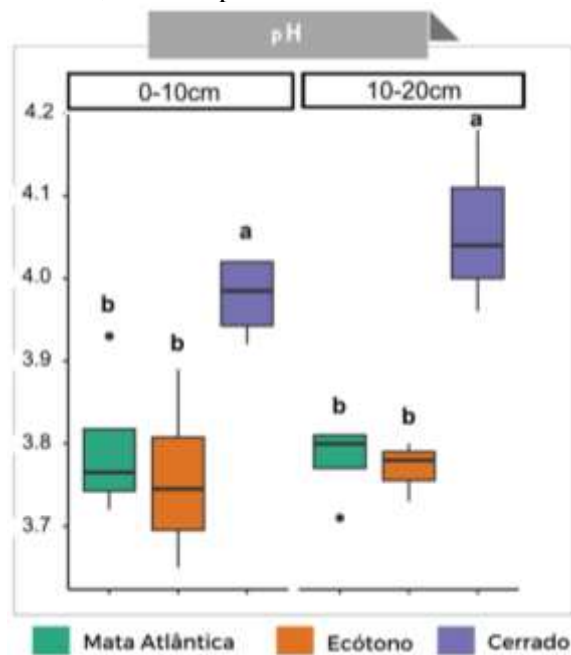
Análises de *networks* foram utilizadas para avaliar os padrões de correlação com base em taxonomia (LIU *et al.*, 2021). Para tal, as análises de co-ocorrência não-aleatórias foram realizadas usando o método SparCC (FRIEDMAN; ALM, 2012). Para cada área, foram construídas redes tanto para taxonomia quanto para funções, considerando apenas correlações fortes (SparCC > 0.8 ou < -0.8) e altamente significativas ($p < 0.001$). Os gráficos de rede foram baseados em um conjunto de medidas, como o número de nós, arestas, modularidade, número de comunidades, conectividade média dos nós, comprimento médio do caminho, diâmetro e distribuição acumulada de grau. A visualização e as propriedades da rede foram calculadas usando a plataforma interativa Gephi (BASTIAN; HEYMANN; JACOMY, 2009).

5. RESULTADOS

5.1. Características físico-químicas do solo e atividade enzimática

As distintas áreas e profundidades resultaram em diferenças em algumas propriedades físico-químicas e na atividade de enzimas extracelulares no solo (Tabela 2). Em geral, o solo coletado em área de Mata Atlântica e ecótono apresentaram características semelhantes. Em contraste, o solo coletado em área de Cerrado foi caracterizado por pH mais elevado (Figura 5) e menores teores de P, Fe e Mn (Figura 6) e, na camada de 0-10cm, uma atividade mais elevada das enzimas fosfatase ácida e alcalina (Figura 7).

Figura 5 – Diferenças entre o pH dos solos amostrados nas parcelas localizadas em área de Mata Atlântica, de ecótono e de Cerrado, em duas profundidades.



Para cada área foram analisadas 10 repetições, sendo cinco para a camada de 0-10cm e cinco para a camada de 10-20cm de profundidade. Letras iguais não diferem significativamente (teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn - $p < 0,05$). Fonte: autoria própria.

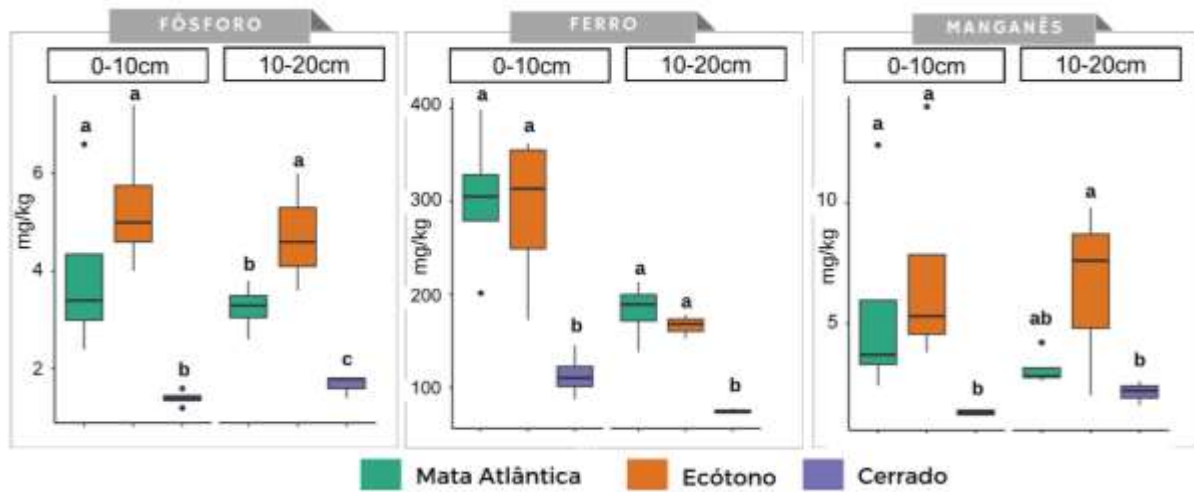
Não foram observadas diferenças nos teores de K, Ca, Mg, Al^3 , S, B, Cu, Zn e na atividade de β -glicosidase e arilsulfatase ao longo do gradiente de solo em ambas as profundidades (Kruskal-Wallis; pós-teste de Dunn: $p > 0,05$) (Tabela 1). Também, não houve diferenças entre as proporções de areia, silte e argila (Kruskal-Wallis; pós-teste de Dunn: $p > 0,05$), fazendo com que todas as áreas amostradas apresentassem a mesma classificação de solo, sendo consideradas de textura areia-franca (LEMOS; SANTOS, 1996).

Tabela 2 - Caracterização dos atributos químicos e físicos, e da atividade enzimática dos solos amostrados nas parcelas localizadas em área de Mata Atlântica, de ecótono e de Cerrado, em duas profundidades.

Propriedades químicas	MA (0-10cm)	MA (10-20cm)	EC (0-10cm)	EC (10-20cm)	CE (0-10cm)	CE (10-20cm)
MOS (g/kg)	15.6 ± 6.4 ^a	12.4 ± 1.5 ^{ab}	15.7 ± 3.1 ^a	17.3 ± 5.2 ^a	14.1 ± 3.5 ^a	11.9 ± 4.5 ^b
pH (CaCl₂)	3.8 ± 0.08 ^b	3.8 ± 0.04 ^b	3.8 ± 0.08 ^b	3.8 ± 0.04 ^b	4.0 ± 0.14 ^a	4.0 ± 0.08 ^a
P (mg/kg)	3.8 ± 1.6 ^a	3.1 ± 0.5 ^b	5.2 ± 1.3 ^a	5.0 ± 1.6 ^a	1.5 ± 0.2 ^b	1.5 ± 0.2 ^c
K (mmol/kg)	0.7 ± 0.2 ^a	0.6 ± 0.06 ^a	0.9 ± 0.7 ^a	0.8 ± 0.3 ^a	0.9 ± 0.2 ^a	1.1 ± 0.6 ^a
Ca (mmol/kg)	2.3 ± 2.6 ^a	1.2 ± 0.3 ^a	2.2 ± 1.5 ^a	2.0 ± 1.2 ^a	1.3 ± 0.6 ^a	1.2 ± 0.5 ^a
Mg (mmol/kg)	1.6 ± 1.0 ^a	1.2 ± 0.3 ^a	2.3 ± 1.1 ^a	2.0 ± 0.8 ^a	3.0 ± 1.9 ^a	1.6 ± 0.4 ^a
Al³ (mmol/kg)	12.3 ± 0.8 ^a	12.6 ± 0.9 ^a	13.9 ± 2.2 ^a	14.3 ± 3.7 ^a	10.7 ± 2.0 ^a	10.0 ± 0.4 ^a
S (mg/kg)	0.8 ± 0.5 ^a	3.7 ± 3.1 ^a	6.7 ± 5.0 ^a	4.9 ± 3.4 ^a	2.1 ± 1.9 ^a	4.6 ± 3.1 ^a
B (mg/kg)	0.2 ± 0.08 ^a	0.2 ± 0.08 ^a	0.2 ± 0.02 ^a	0.2 ± 0.05 ^a	0.1 ± 0.08 ^a	0.2 ± 0.04 ^a
Cu (mg/kg)	0.6 ± 0.07 ^a	0.5 ± 0.01 ^a	0.7 ± 0.2 ^a	0.6 ± 0.15 ^a	0.7 ± 0.07 ^a	0.6 ± 0.05 ^a
Fe (mg/kg)	300.4 ± 69.9 ^a	182.4 ± 27.5 ^a	275.4 ± 21.6 ^a	190.9 ± 15.1 ^a	115.4 ± 83.0 ^b	75.8 ± 39.9 ^b
Mn (mg/kg)	5.6 ± 0.4 ^a	2.9 ± 0.7 ^{ab}	7.2 ± 4.0 ^a	6.9 ± 4.2 ^a	1.3 ± 0.1 ^a	1.8 ± 0.5 ^b
Zn (mg/kg)	0.5 ± 0.3 ^a	0.5 ± 0.1 ^a	0.6 ± 0.2 ^a	0.6 ± 0.2 ^a	0.3 ± 0.1 ^a	0.4 ± 0.2 ^a
Propriedades físicas	MA (0-10cm)	MA (10-20cm)	EC (0-10cm)	EC (10-20cm)	CE (0-10cm)	CE (10-20cm)
Areia	831 ± 44.4 ^a	835 ± 9.3 ^a	804 ± 23.5 ^a	815 ± 18.8 ^a	812 ± 15.9 ^a	842 ± 5.7 ^a
Argila	137 ± 34.3 ^a	136 ± 11.2 ^a	157 ± 11.6 ^a	164 ± 9.8 ^a	132 ± 5.3 ^a	141 ± 4.3 ^a
Silte	32 ± 56.5 ^a	29 ± 6.9 ^b	39 ± 23.5 ^a	22 ± 18.8 ^a	55 ± 12.3 ^a	16 ± 7.4 ^b
Atividade enzimática	MA (0-10cm)	MA (10-20cm)	EC (0-10cm)	EC (10-20cm)	CE (0-10cm)	CE (10-20cm)
Fosfatase ácida (µg p-nitrofenol g⁻¹ h⁻¹)	314.9 ± 110.6 ^b	276.8 ± 23.3 ^a	272.3 ± 72.4 ^b	407.3 ± 79.3 ^a	499.1 ± 101.4 ^a	405.3 ± 269.8 ^a
Fosfatase alcalina (µg p-nitrofenol g⁻¹ h⁻¹)	52.7 ± 41.4 ^a	22.1 ± 2.6 ^b	20.5 ± 25.8 ^a	5.73 ± 8.2 ^b	48.87 ± 32.8 ^a	61.3 ± 26.0 ^a
β-glucosidase (µg p-nitrofenol g⁻¹ h⁻¹)	14.3 ± 4.6 ^a	18.7 ± 2.8 ^a	15.7 ± 5.0 ^a	17.51 ± 2.5 ^a	21.1 ± 11.2 ^a	13.5 ± 3.7 ^a
Arilsulfatase (µg p-nitrofenol g⁻¹ h⁻¹)	39.2 ± 2.9 ^a	42.4 ± 7.1 ^a	31.0 ± 10.8 ^a	28.5 ± 8.3 ^a	26.5 ± 11.9 ^a	31.4 ± 7.8 ^a

Para cada área foram analisadas 10 repetições, sendo cinco para a camada de 0-10cm e cinco para a camada de 10-20cm de profundidade. Letras iguais não diferem significativamente (teste de comparações múltiplas de KW, seguido pelo teste de Dunn - $p < 0,05$). MOS = matéria orgânica do solo; P = fósforo; K = potássio; Ca = cálcio; Mg = magnésio; Al³ = alumínio; S = enxofre; B = boro; Cu = Cobre; Fe = Ferro; Mn = manganês; Zn = zinco. Fonte: autoria própria.

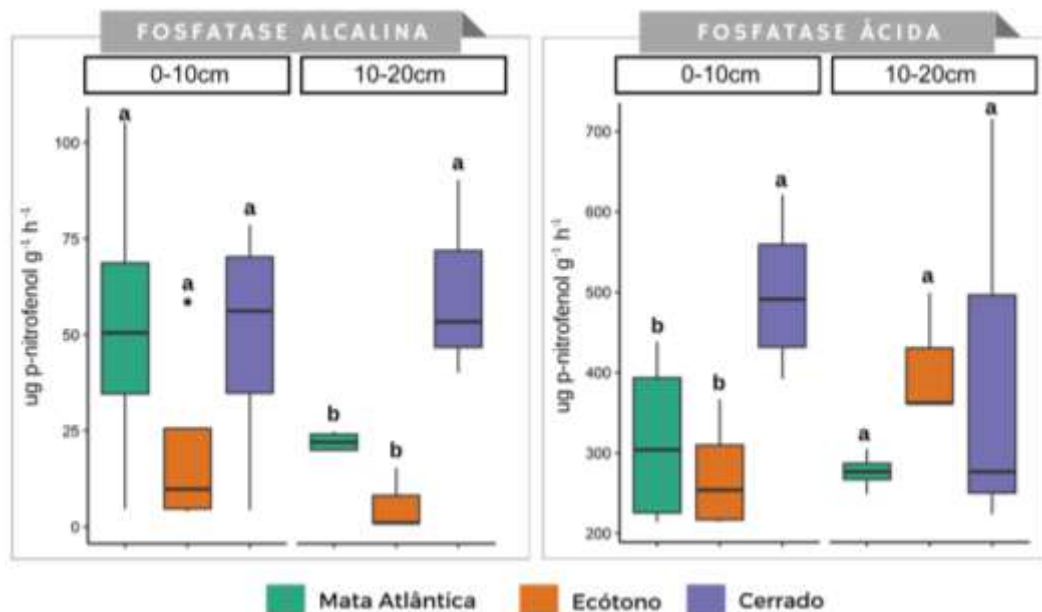
Figura 6 - Diferenças entre as quantidades de fósforo, ferro e manganês disponíveis nos solos amostrados nas parcelas localizadas em área de Mata Atlântica, de ecótono e de Cerrado, em duas profundidades.



Para cada área foram analisadas 10 repetições, sendo cinco para a camada de 0-10cm e cinco para a camada de 10-20cm de profundidade. Letras iguais não diferem significativamente (teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn - $p < 0,05$). Fonte: autoria própria.

Considerando especificamente a profundidade de 0-10 cm, houve diferença entre a atividade da fosfatase ácida nas diferentes áreas (Kruskal-Wallis; pós-teste de Dunn: $p < 0,05$), com solo coletado na parcela de Cerrado apresentando maior atividade desta enzima (Figura 7).

Figura 7 - Diferenças entre as atividades das enzimas extracelulares fosfatase ácida e alcalina nos solos amostrados nas parcelas localizadas em área de Mata Atlântica, de ecótono e de Cerrado, em duas profundidades.

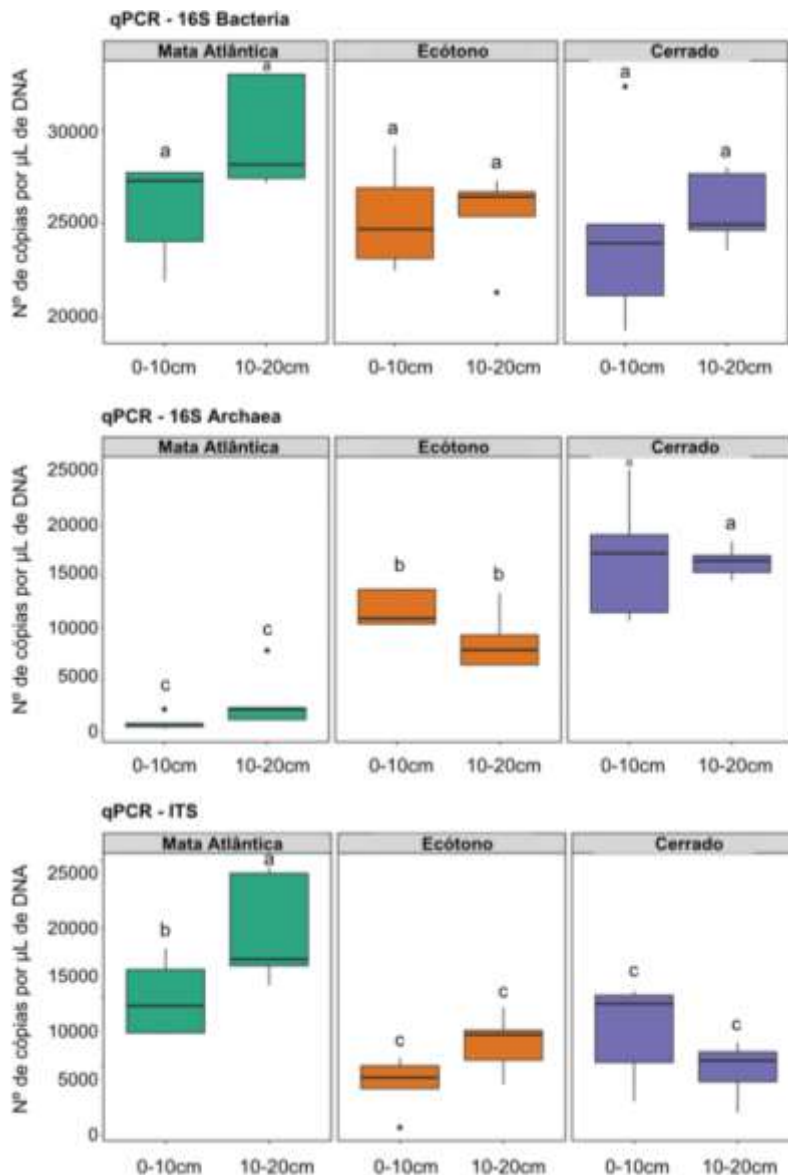


Para cada área foram analisadas 10 repetições, sendo cinco para a camada de 0-10cm e cinco para a camada de 10-20cm de profundidade. Letras iguais não diferem significativamente (teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn - $p < 0,05$). Fonte: autoria própria.

5.2. Composição e diversidade da comunidade microbiana

As comunidades bacterianas e fúngicas apresentaram composição e abundância semelhantes em todos os solos e profundidades, sendo os fungos apenas mais abundantes no solo coletado em área de Mata Atlântica ($p < 0.05$). Em contraste, a abundância de arqueias aumentou no gradiente Mata Atlântica-Cerrado ($p < 0.05$), sendo maior no solo de Cerrado (Cerrado = 16614.14 ± 4089.89 , ecótono = $10325,81 \pm 2797,50$ e Mata Atlântica = $1961,56 \pm 2211,53$ cópias de genes) (Figura 8).

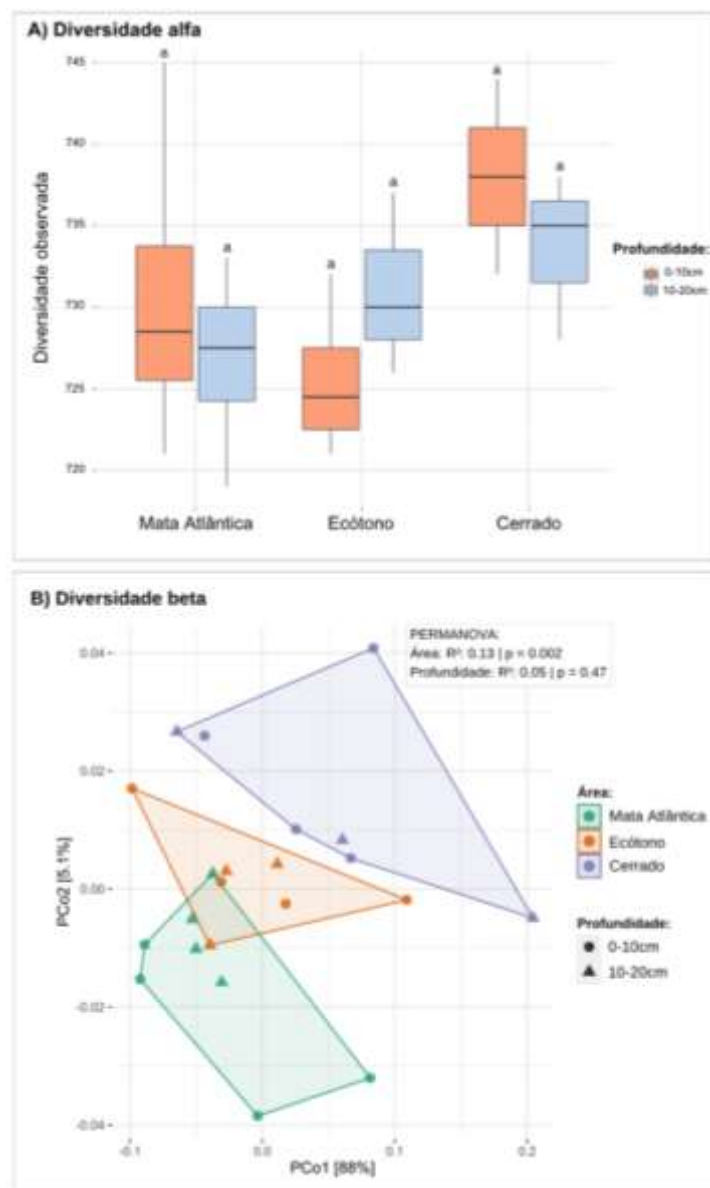
Figura 8 – Abundância relativa de genes avaliada através da análise de qPCR de amostras de solos das parcelas localizadas em área de Mata Atlântica, de ecótono e de Cerrado, em duas profundidades.



Para cada área foram analisadas 10 repetições, sendo cinco para a camada de 0-10cm e cinco para a camada de 10-20cm de profundidade. Letras iguais não diferem significativamente (ANOVA - $p < 0,05$). Fonte: autoria própria.

Embora não tenha havido diferença na diversidade alfa ($p > 0.05$) (Figura 9A), a análise de coordenadas principais (PCoA), utilizada para representar a diversidade beta, demonstrou um agrupamento entre as amostras de uma mesma área, porém, dividindo áreas diferentes (Figura 9B), o que foi confirmado pela PERMANOVA ($R^2 = 0.1319$; $p = 0.002$). Não foi observado efeito significativo da profundidade no agrupamento das amostras (PERMANOVA: $R^2 = 0.04$; $p = 0.47$) (Figura 9B).

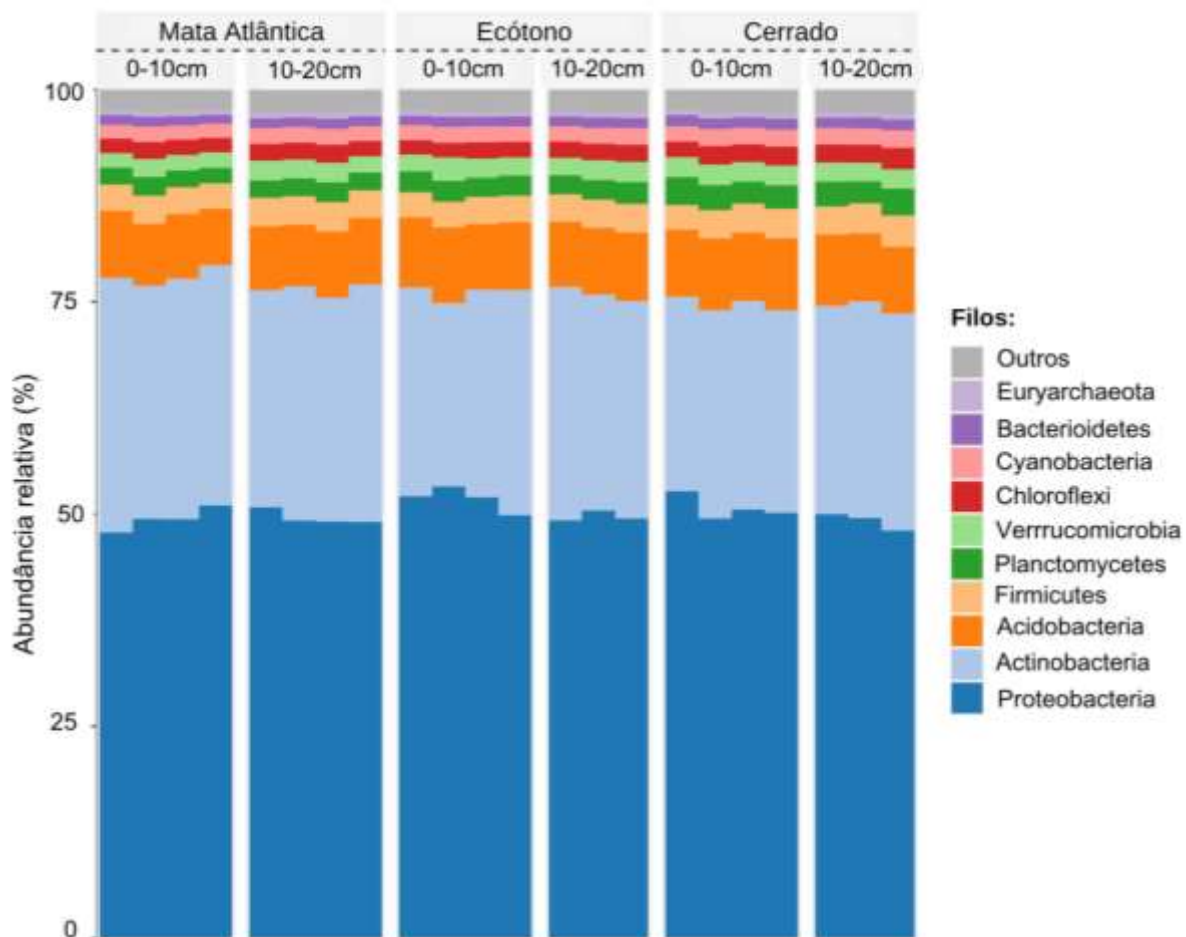
Figura 9 – Diversidade alfa e beta para as comunidades microbiana presentes nos solos amostrados nas parcelas localizadas em área de Mata Atlântica, de ecótono e de Cerrado, em duas profundidades.



A) Diversidade alfa de cada área. Letras iguais não diferem significativamente (teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis, correção: Benjamini-Hochberg - $p < 0,05$). B) Diversidade beta comparando as diferentes áreas (diferenças avaliadas através da análise de PERMANOVA). Para as análises de diversidade alfa e beta, foram consideradas oito réplicas para o solo amostrado na parcela de Mata Atlântica (quatro para 0-10cm e quatro para 10-20cm), sete para o solo amostrado na parcela de ecótono (quatro para 0-10cm e três para 10-20cm), e sete para o solo amostrado na parcela de Cerrado (quatro para 0-10cm e três para 10-20cm). Fonte: autoria própria.

A comunidade microbiana total analisada foi composta por 38 filós, sendo 28 de bactérias, cinco de arqueias e cinco de fungos. Proteobacteria (50.08%), Actinobacteria (24.70%), Acidobacteria (6.88%), Firmicutes (3.14%), Planctomycetes (2.10%), Verrucomicrobia (2.09%), Chloroflexi (1.64%), Cyanobacteria (1.63%), Bacteroidetes (1.03%) e Euryarchaeota (0.60%) foram os filós mais abundantes para todas as amostras e profundidades, representando juntos 93,89% da comunidade microbiana (Figura 10). Com a exceção do filo Euryarchaeota, todos os outros mais abundantes são pertencentes ao domínio Bacteria, demonstrando a predominância deste grupo nos diferentes solos.

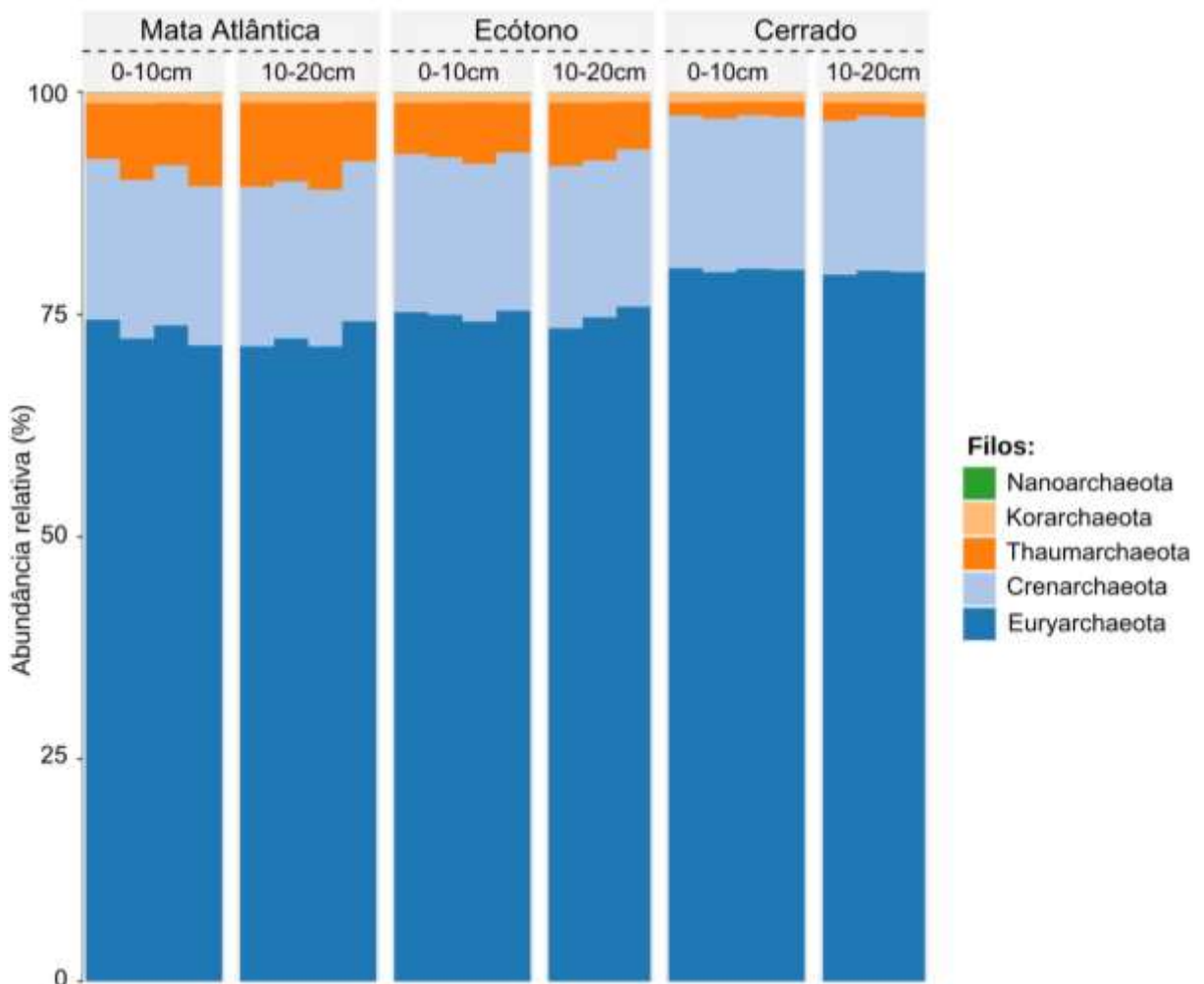
Figura 10 – Composição das comunidades microbianas totais (considerando bactérias, arqueias e fungos) a nível de filo nos solos amostrados nas parcelas localizadas em área de Mata Atlântica, de ecótono e de Cerrado, em duas profundidades.



Para esta análise, foram consideradas oito réplicas para o solo amostrado na parcela de Mata Atlântica (quatro para 0-10cm e quatro para 10-20cm), sete para o solo amostrado na parcela de ecótono (quatro para 0-10cm e três para 10-20cm), e sete para o solo amostrado na parcela de Cerrado (quatro para 0-10cm e três para 10-20cm). Fonte: autoria própria.

Para as comunidades de arqueias, os filos Euryarchaeota, Crenarchaeota e Thaumarchaeota foram classificados como os mais abundantes neste estudo, representando mais de 90% da abundância relativa total da comunidade de arqueias no solo (Figura 11). Ainda, especificamente, no solo coletado em área de Cerrado, foi observado que a abundância de Thaumarchaeota foi menor do que para os solos coletados nas outras áreas, enquanto Euryarchaeota teve um aumento em sua abundância.

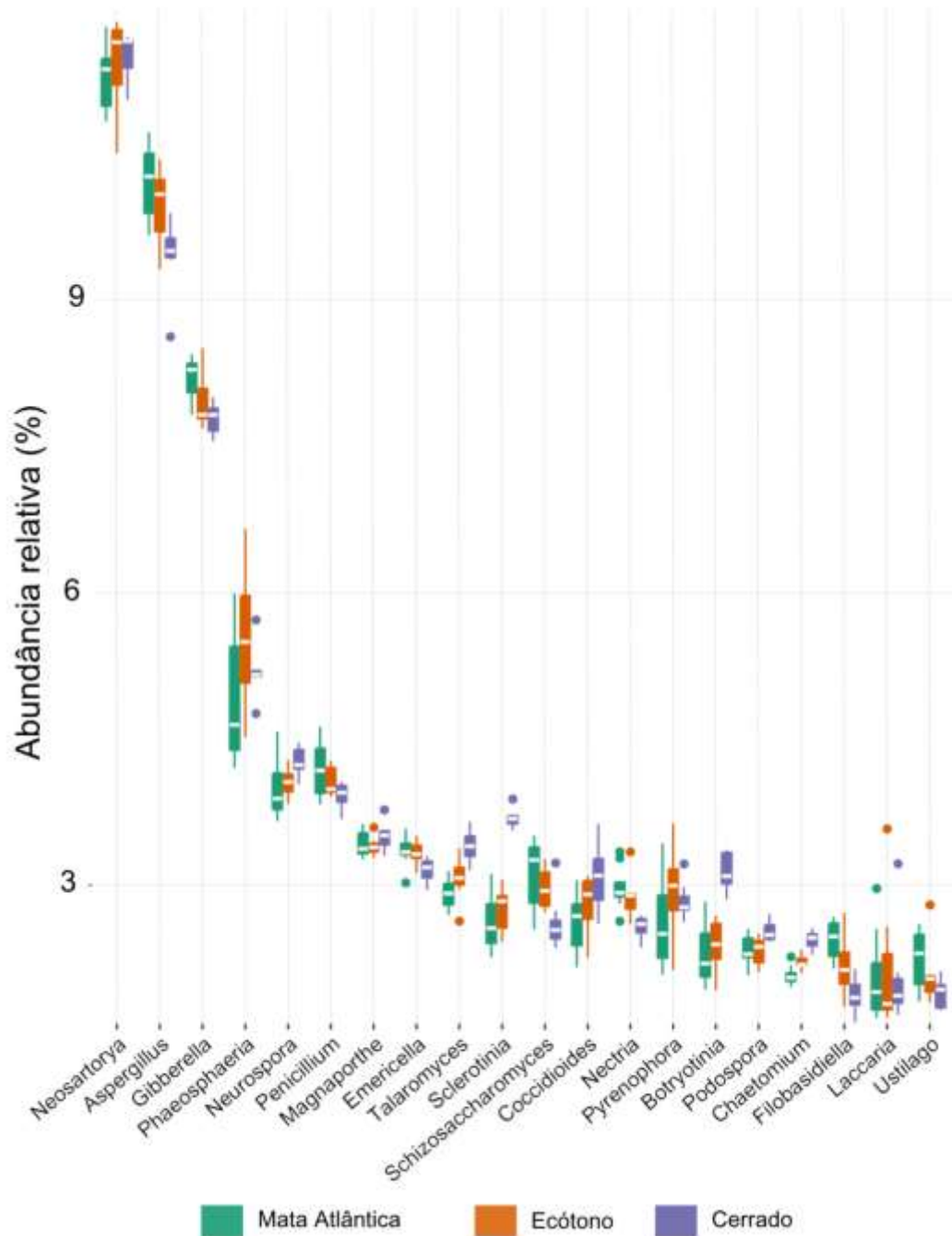
Figura 11 – Composição das comunidades de arqueias a nível de filo nos solos amostrados nas parcelas localizadas em área de Mata Atlântica, de ecótono e de Cerrado, em duas profundidades.



Para esta análise, foram consideradas oito réplicas para o solo amostrado na parcela de Mata Atlântica (quatro para 0-10cm e quatro para 10-20cm), sete para o solo amostrado na parcela de ecótono (quatro para 0-10cm e três para 10-20cm), e sete para o solo amostrado na parcela de Cerrado (quatro para 0-10cm e três para 10-20cm). Fonte: autoria própria.

A comunidade de fungos apresentou composição similar nos solos das três áreas. Os gêneros *Neosartorya*, *Aspergillus*, *Gibberella*, *Phaeosphaeria* e *Neuspora* foram dominantes, demonstrando a prevalência do filo Ascomycota (Figura 12).

Figura 12 - Distribuição de gêneros de fungos nos solos amostrados nas parcelas localizadas em área de Mata Atlântica, de ecótono e de Cerrado.



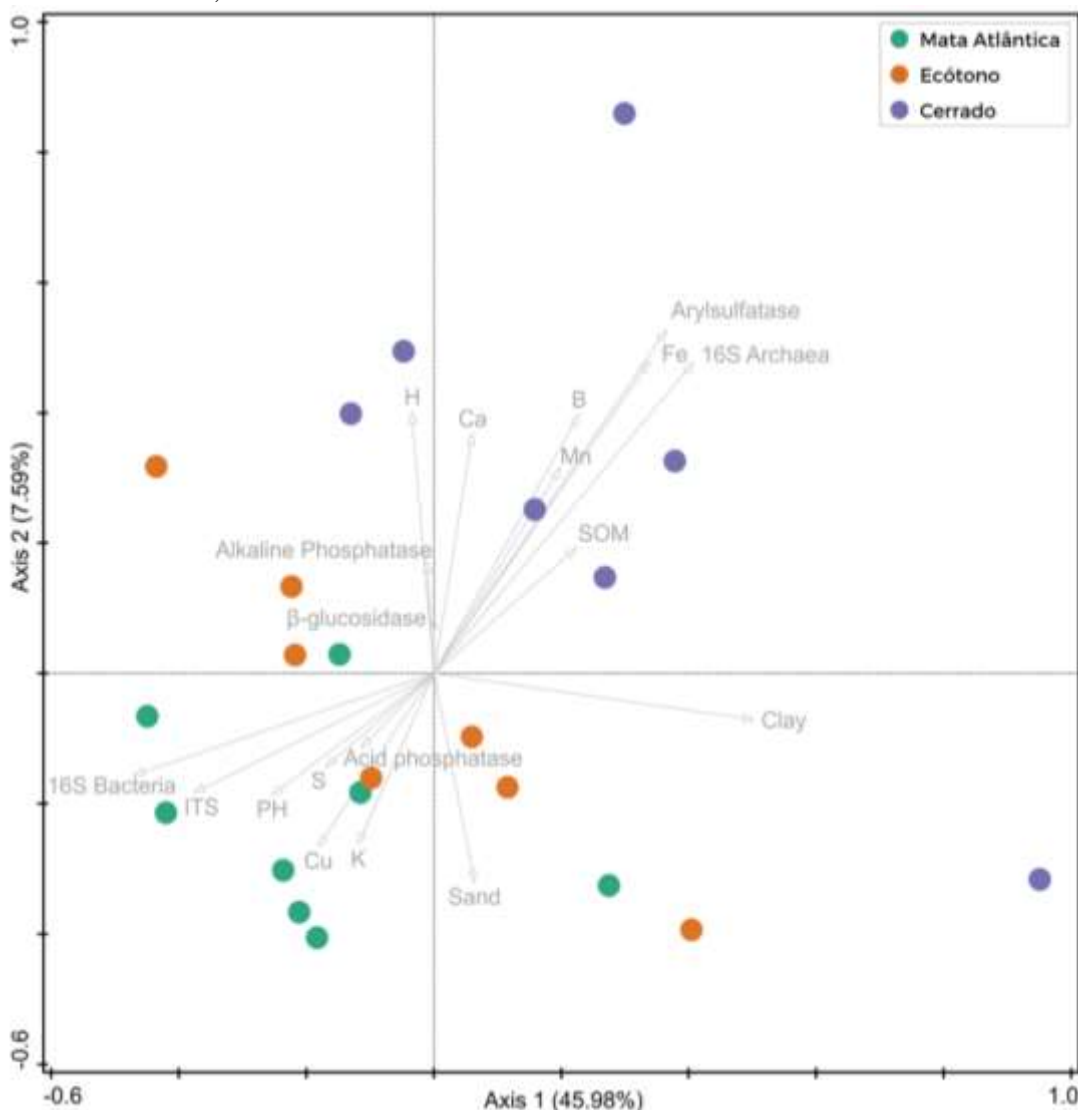
Para esta análise, foram consideradas oito réplicas para o solo amostrado na parcela de Mata Atlântica (quatro para 0-10cm e quatro para 10-20cm), sete para o solo amostrado na parcela de ecótono (quatro para 0-10cm e três para 10-20cm), e sete para o solo amostrado na parcela de Cerrado (quatro para 0-10cm e três para 10-20cm). Fonte: autoria própria.

5.3. Estrutura da comunidade microbiana

A análise de redundância (RDA) foi utilizada para avaliar a estrutura taxonômica das comunidades microbianas e relacioná-las com as propriedades físico-químicas do solo,

atividade enzimática e abundância de genes nas áreas. Independente da profundidade, todas as amostras foram agrupadas em relação à área, sendo que os dois primeiros eixos do gráfico explicaram mais de 50% da variação dos dados (Figura 13). Considerando o centro da dispersão como o ponto inicial, as amostras de solo de Mata Atlântica e de Cerrado foram agrupadas em regiões opostas do gráfico. Já as amostras de solo de ecótono se mostraram intermediárias em relação às das outras duas áreas.

Figura 13 - Análise de redundância (RDA) entre os perfis taxonômicos da comunidade microbiana, as propriedades físico-químicas e atividade enzimática nos solos amostrados nas parcelas localizadas em área de Mata Atlântica, de ecótono e de Cerrado.

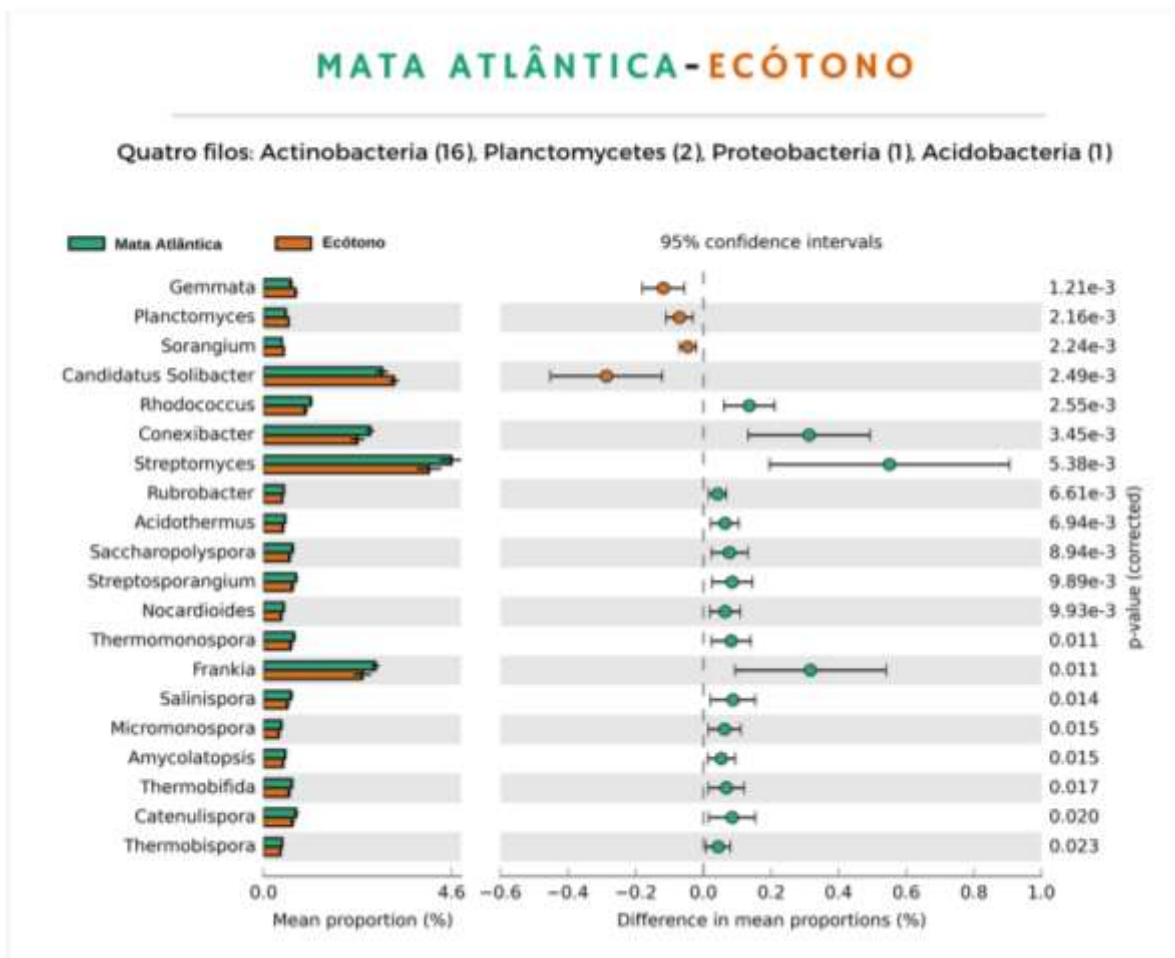


Para esta análise, foram consideradas oito réplicas para o solo amostrado na parcela de Mata Atlântica, sete para o solo amostrado na parcela de ecótono, e sete para o solo amostrado na parcela de Cerrado. As diferentes profundidades não foram consideradas para essas análises, sendo todas as amostras de cada área consideradas como réplicas. As setas indicam a correlação entre as propriedades do solo e as comunidades microbianas. As variáveis explicativas que melhoraram o modelo foram selecionadas através de testes de permutação de Monte Carlo, com 1000 permutações aleatórias. Fonte: autoria própria.

A atividade da enzima extracelular arilsulfatase, a abundância relativa de arqueias e outros fatores como a quantidade de ferro e de manganês foram relacionados ao solo da área de Cerrado. Já o solo da área de Mata Atlântica apresentou relação com parâmetros como a abundância relativa de bactérias e fungos e pH.

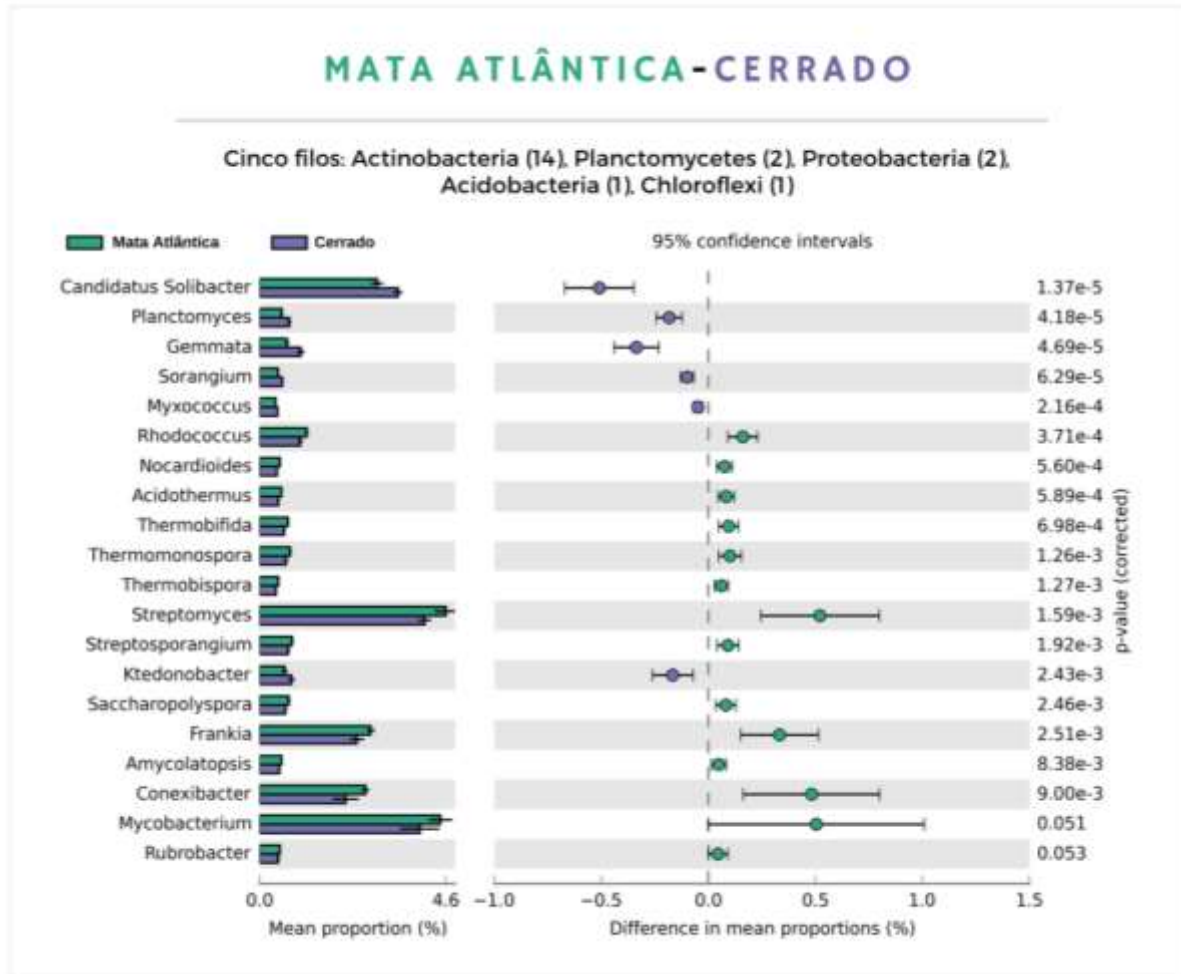
A análise de abundância diferencial para as três áreas mostrou que as espécies com maior abundância diferencial nos solos de Cerrado pertencem a filos distintos, como Chloroflexi, Planctomycetes e Acidobacteria. Considerando as comparações Mata Atlântica-Ecótano (Figura 14) e Mata Atlântica-Cerrado (Figura 15), para ambos os casos, todos os gêneros que foram diferencialmente mais abundantes nos solos de Mata Atlântica pertencem ao filo Actinobacteria.

Figura 14 - Análise de abundância diferencial a nível de gênero para comunidades de bactérias, arqueias e fungos nos solos amostrados nas parcelas localizadas em área de Mata Atlântica e de ecótano.



Para esta análise, foram consideradas oito réplicas para o solo amostrado na parcela de Mata Atlântica e sete para o solo amostrado na parcela de ecótano. As diferentes profundidades não foram consideradas para essas análises, sendo todas as amostras de cada área consideradas como réplicas. A partir dos dados gerados pelo método ALDEx2, o teste t de Welch foi realizado para os níveis de significância: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$. Apenas os 20 táxons mais significativamente alterados para cada comparação são mostrados. Fonte: autoria própria.

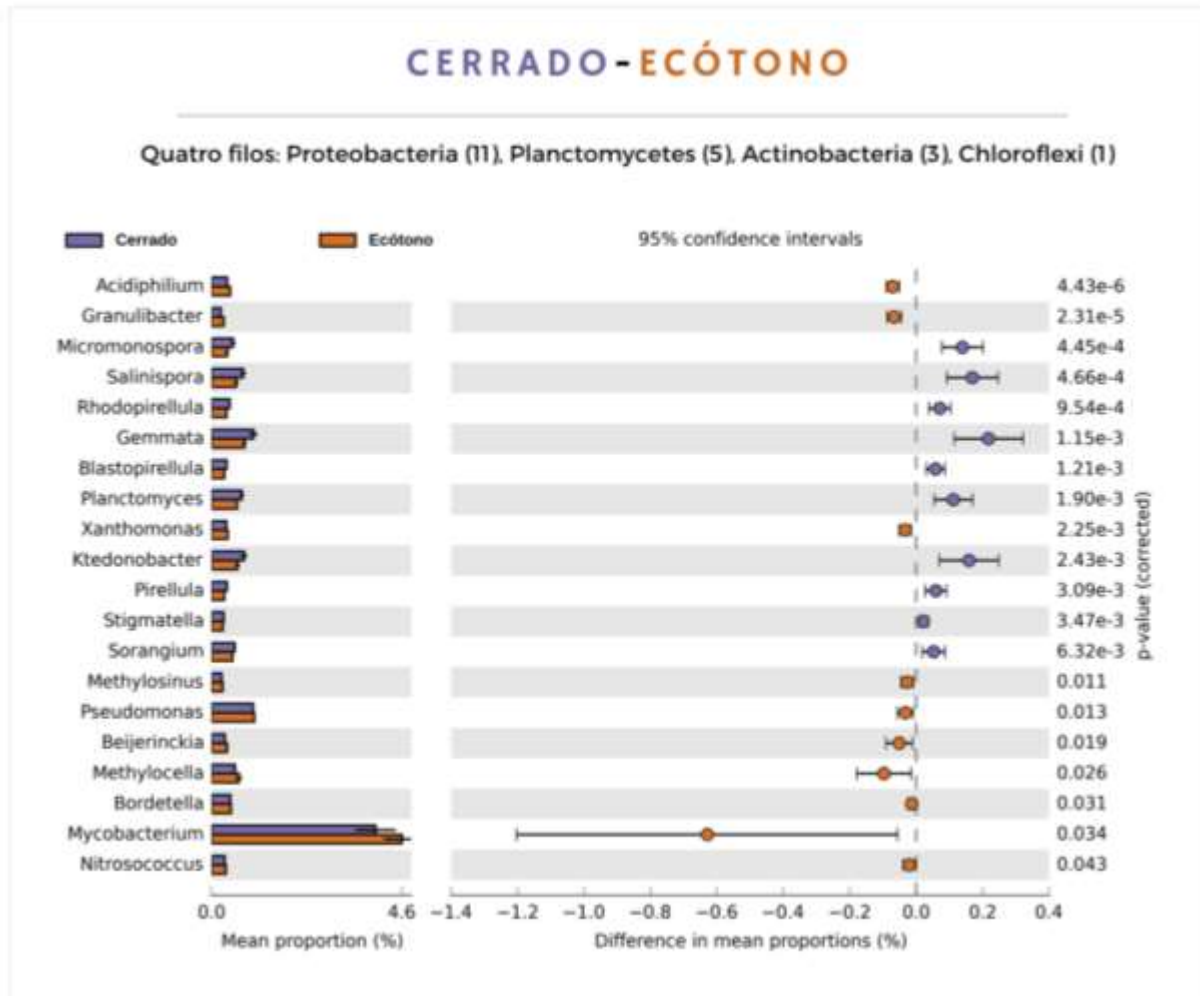
Figura 15 - Análise de abundância diferencial a nível de gênero para comunidades de bactérias, arqueias e fungos nos solos amostrados nas parcelas localizadas em área de Mata Atlântica e de Cerrado.



Para esta análise, foram consideradas oito réplicas para o solo amostrado na parcela de Mata Atlântica e sete para o solo amostrado na parcela de Cerrado. As diferentes profundidades não foram consideradas para essas análises, sendo todas as amostras de cada área consideradas como réplicas. A partir dos dados gerados pelo método ALDEx2, o teste t de Welch foi realizado para os níveis de significância: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$. Apenas os 20 táxons mais significativamente alterados para cada comparação são mostrados. Fonte: autoria própria.

Já para a abundância diferencial na comparação Cerrado-Ecótano (Figura 16), foi observado que nove das 10 espécies mais abundantes no solo de Ecótano pertencem ao filo Proteobacteria.

Figura 16 - Análise de abundância diferencial a nível de gênero para comunidades de bactérias, arqueias e fungos nos solos amostrados nas parcelas localizadas em área de Cerrado e de ecótono.



Para esta análise, foram consideradas sete réplicas para o solo amostrado na parcela de Cerrado, e sete para o solo amostrado na parcela de ecótono. As diferentes profundidades não foram consideradas para essas análises, sendo todas as amostras de cada área consideradas como réplicas. A partir dos dados gerados pelo método ALDEx2, o teste t de Welch foi realizado para os níveis de significância: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$. Apenas os 20 táxons mais significativamente alterados para cada comparação são mostrados. Fonte: autoria própria.

Utilizamos análises de *Networks* para investigar a complexidade das interações nas comunidades microbianas dos solos das três áreas. O solo da área de Mata Atlântica apresentou o maior número de correlações fortes significativas e maior grau médio (2606 e 31.97, respectivamente) em comparação com o solo da área de ecótono (1726 e 21.18, respectivamente) e de Cerrado (1199 e 14.99, respectivamente) (Tabela 3).

Tabela 3 – Características topológicas das *networks* calculadas a partir das análises de correlações, considerando os solos amostrados nas parcelas localizadas em área de Mata Atlântica, de ecótono e de Cerrado.

Características topológicas da <i>network</i>	Mata Atlântica	Ecótono	Cerrado
Número de nós ^a	163	163	160
Número de arestas ^b	2606	1726	1199
Grau médio ^c	31.97	21.18	14.99
Modularidade ^d	0.136	0.167	0.218
Coeficiente de clustering médio ^e	0.227	0.149	0.108
Comprimento médio do caminho ^f	1.82	1.95	2.15
Arestas positivas ^g	1538	1271	803
Arestas negativas ^h	1067	454	396

Para as análises de *network*, as diferentes profundidades não foram consideradas, com todas as amostras sendo consideradas como réplicas.

^aTaxa microbiana (nível de OTU) com pelo menos uma correlação significativa ($p < 0.001$) e forte (SparCC > 0.8 ou < -0.8);

^bNúmero de conexões (correlações) obtidas pela análise de correlação (SparCC);

^cNúmero médio de conexões por nó (OTU) na *network*;

^dCapacidade dos nós de formarem comunidades altamente conectadas, ou seja, uma estrutura de alta densidade de conexões entre nós;

^eComo os nós (OTUs) estão inseridos em sua vizinhança e o grau em que eles tendem a se agrupar;

^fDistância média entre todos os nós na *network*;

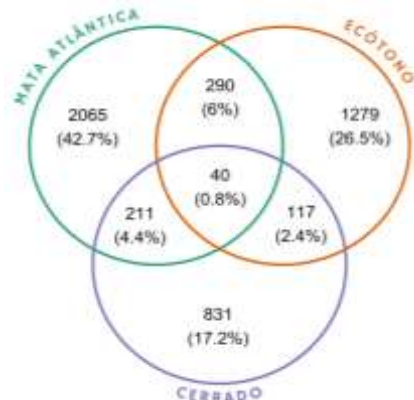
^gCorrelação positiva (SparCC: > 0.8 e $p < 0.001$);

^hCorrelação negativa (SparCC: < -0.8 e $p < 0.001$).

Fonte: autoria própria.

Considerando todas as correlações fortes e significativas existentes nas *networks* das três áreas, foi observado que apenas 0.8% delas são compartilhadas pelas comunidades das três áreas (Figura 17). A baixa proporção se mantém quando analisadas as interações de duas áreas somente (4.4% para a interação Mata Atlântica-Cerrado, 6% para a interação Mata Atlântica-ecótono e 2.4% para a interação Cerrado-ecótono), indicando que, para os solos estudados, a maioria das correlações significativas ocorre exclusivamente em cada uma das três áreas.

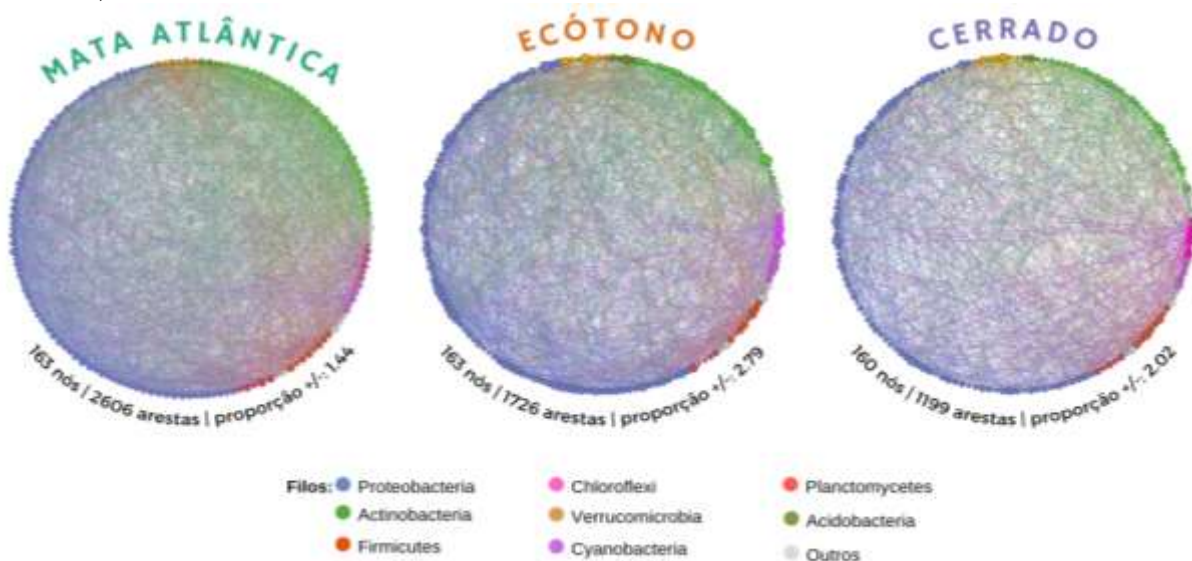
Figura 17 – Diagrama de Venn representando as arestas exclusivas e compartilhadas nas *networks* dos solos amostrados nas parcelas localizadas em área de Mata Atlântica, de ecótono e de Cerrado.



Fonte: autoria própria.

Para o solo das três áreas, o número de táxons que tiveram pelo menos uma correlação positiva ou negativa forte e significativa (classificados pela característica “Número de nós”) foi semelhante (Tabela 3), bem como os principais filós responsáveis pelas interações, sendo eles Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Chloroflexi, Verrucomicrobia, Cyanobacteria, Planctomycetes e Acidobacteria (Figura 18). Todas as áreas apresentaram maior número de correlações positivas do que negativas, porém, o solo da área de Mata Atlântica apresentou uma menor proporção entre estas correlações (1.44) (Figura 18).

Figura 18 – *Networks* construídas a partir de análises de co-ocorrência não-aleatórias para as comunidades microbianas presentes nos solos amostrados nas parcelas localizadas em área de Mata Atlântica, de ecótono e de Cerrado.

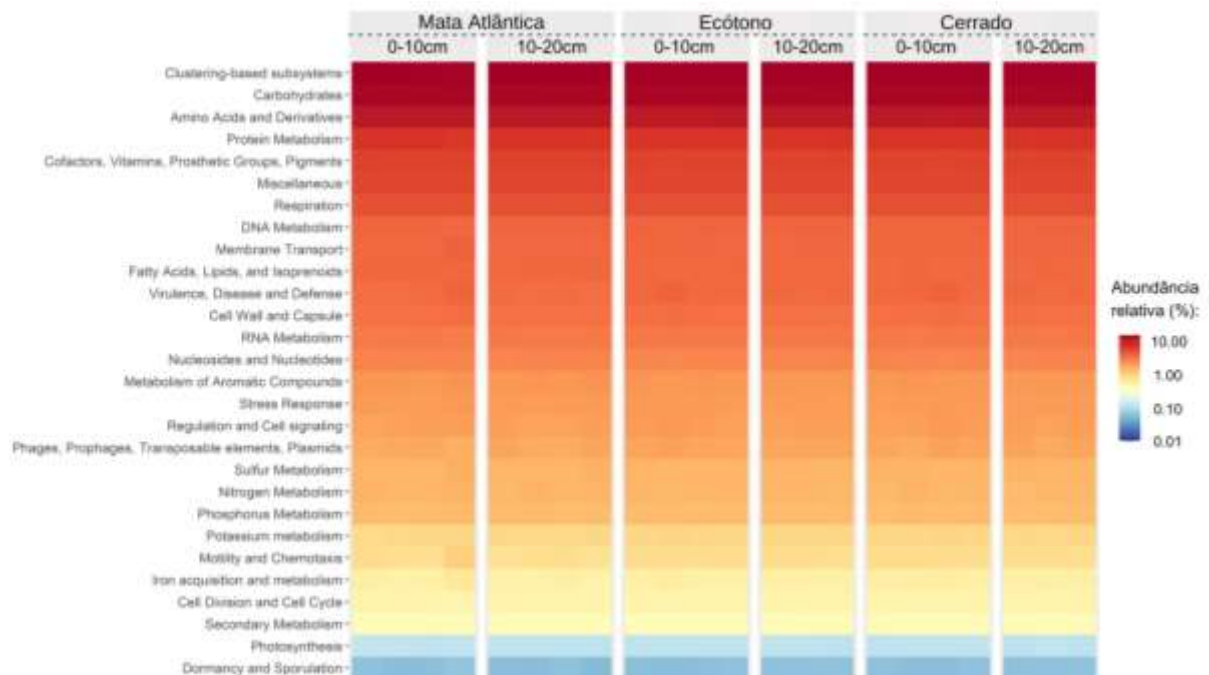


As diferentes profundidades não foram consideradas para essas análises, sendo todas as amostras de cada área consideradas como réplicas. Uma aresta corresponde a uma correlação significativa ($SparCC > 0,8 < -0,8$) e estatisticamente significativa ($p < 0,001$). Cada nó representa táxons ao nível de OTU e o tamanho do nó é proporcional ao número de conexões (grau). As cores dos nós e das arestas representam diferentes filós. Fonte: autoria própria.

5.4. Potencial perfil funcional das comunidades de microrganismos do solo

Os metagenomas avaliados a partir do DNA dos solos das três áreas foram atribuídos a 28 potenciais categorias funcionais (*subsystem level 1*), sendo as principais *Clustering-based subsystems* (que incluem funções em que há acoplamento de proteínas, mas cujas funções ainda não são definidas), *Carbohydrates*, (que incluem funções relacionadas ao metabolismo de açúcares) e *Amino Acids and Derivatives* (que englobam funções relacionadas ao metabolismo de compostos que derivam de aminoácidos) (Figura 19).

Figura 19 - *Heatmap* mostrando a abundância relativa potenciais funções (subsistema nível 1) encontradas nos solos amostrados nas parcelas localizadas em área de Mata Atlântica, de ecótono e de Cerrado.



Para esta análise, foram consideradas oito réplicas para o solo amostrado na parcela de Mata Atlântica (quatro para 0-10cm e quatro para 10-20cm), sete para o solo amostrado na parcela de ecótono (quatro para 0-10cm e três para 10-20cm), e sete para o solo amostrado na parcela de Cerrado (quatro para 0-10cm e três para 10-20cm). Fonte: autoria própria.

6. DISCUSSÃO

6.1. Características físico-químicas do solo e atividade enzimática

Em geral, as propriedades dos solos em florestas naturais protegidas de distúrbios tendem a serem mantidas (POWERS; MARÍN-SPIOTTA, 2017; SAFAR *et al.*, 2019), o que pode explicar a similaridade encontrada entre alguns parâmetros químicos nos solos amostrados nas diferentes áreas e profundidades. Ainda, a textura do solo é uma das propriedades que pode afetar fortemente as comunidades de microrganismos (PROCÓPIO; BARRETO, 2021), porém, como todos os pontos amostrados possuem a mesma textura, tendo, inclusive, granulometrias muito próximas, foi considerado que este fator não influenciou os resultados deste estudo.

Os valores de pH encontrados para o solo da área de Mata Atlântica são inferiores aos relatados na literatura (ARAUJO *et al.*, 2018; BARROS OZÓRIO *et al.*, 2020; CUNHA; FONTES; LANI, 2019), indicando um ambiente mais ácido na área estudada, o que pode influenciar diretamente as comunidades microbianas nele presentes (ARAUJO *et al.*, 2018).

A maior atividade da enzima fosfatase ácida no solo da área de Cerrado, principalmente na camada de 0-10cm, onde normalmente há maior atividade enzimática promovendo uma rápida ciclagem de nutrientes e uma acelerada mineralização (MARGALEF *et al.*, 2017), indica uma microbiota ativa em catalisar a hidrólise do fósforo orgânico neste solo, o tornando disponível para as plantas. Ainda, a quantidade de fósforo disponível no solo da parcela de Cerrado foi significativamente menor, característica comum para solos de Cerrado (PROCÓPIO; BARRETO, 2021), corroborando com a maior atividade enzimática neste mesmo local. Uma vez que controle da fosfatase ácida e alcalina se dá por *feedback* negativo, quanto menor a disponibilidade de fósforo no solo, maior será a atividade enzimática transformando o fósforo presente na matéria orgânica em formas que outros organismos possam assimilar (MARGALEF *et al.*, 2017; 2021). Considerando que o fósforo é um dos principais macronutrientes necessários para o sucesso das plantas (IDOWU *et al.*, 2008; MENDES *et al.*, 2019), sendo essencial para processos como a geração de energia celular, a formação de estruturas celulares e de ácidos nucleicos (MARGALEF *et al.*, 2017), a atuação da comunidade microbiana capaz de produzir enzimas extracelulares responsáveis pela mineralização do fósforo é essencial para a manutenção do ecossistema.

6.2. Composição e diversidade da comunidade microbiana

Representando 81.66% da abundância relativa total de microrganismos encontrados nos três solos, os filos Proteobacteria, Actinobacteria e Acidobacteria são amplamente distribuídos em solos de todo o mundo (BARKA *et al.*, 2016; DAI *et al.*, 2018; KIM *et al.*, 2021; LEE; KA; CHO, 2008; NAVARRETE *et al.*, 2013; SPAIN; KRUMHOLZ; ELSHAHED, 2009).

O filo Proteobacteria, predominante nos solos avaliados neste estudo (50,08% da abundância relativa da comunidade), é o maior e mais diverso filo bacteriano conhecido (KERSTERS *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2021; SPAIN; KRUMHOLZ; ELSHAHED, 2009). Este grupo engloba organismos de fundamental importância em ciclos biogeoquímicos, como do carbono e enxofre, nos solos de diversos ambientes, além das espécies com maior importância nas áreas médicas, veterinárias e agrícolas (KERSTERS *et al.*, 2006), incluindo bactérias fixadoras de nitrogênio (LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009), essenciais para a formação das comunidades naturais e para a agricultura moderna, podendo promover o crescimento de plantas através da liberação de compostos específicos ou da proteção contra patógenos (LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009). Ainda, nos contextos atuais de perturbação ou degradação de ambientes, como na conversão de florestas para área de cultivos, os filos Proteobacteria e Acidobacteria podem atuar como indicadores das comunidades microbianas e da saúde do solo (KIM *et al.*, 2021). Na literatura, é relatado que este filo é predominante em solos de florestas tropicais e em solos de Cerrado, corroborando com os resultados encontrados neste estudo (MENDES *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2016; WEI *et al.*, 2018).

Compreendendo 24.70% da abundância relativa da comunidade de microrganismos nos solos estudados, Actinobacteria compreende um dos maiores filos bacterianos, estando presentes tanto em ecossistemas terrestres quanto aquáticos (BARKA *et al.*, 2016; HAZARIKA; THAKUR, 2020). A maioria das espécies deste filo são oligotróficas, e, em solos, costumam ser abundantes em ambientes ricos em matéria orgânica (BARKA *et al.*, 2016; DELGADO-BAQUERIZO *et al.*, 2017). Indivíduos pertencentes a este filo podem atuar como fontes de antibióticos (ELBENDARY *et al.*, 2018; SANTOS-ABERTURAS; VIOR, 2022), bioherbicidas, bioinseticidas e antifúngicos naturais (BARKA *et al.*, 2016; HAZARIKA; THAKUR, 2020), apresentando grande potencial biotecnológico (BARKA *et al.*, 2016). Além disso, indivíduos deste filo possuem uma alta capacidade de degradar componentes recalcitrantes no solo, como lignina, quitina e celulose, permitindo que esses compostos sejam utilizados por outros organismos (DELGADO-BAQUERIZO *et al.*, 2017). Como possuem alta capacidade competitiva, conseguem colonizar a rizosfera e promover o crescimento vegetal,

indiretamente pela inibição de microrganismos patogênicos através, por exemplo, da biossíntese de substâncias antibióticas, ou diretamente através da produção de compostos que são absorvidos e utilizados pelas plantas (BARKA *et al.*, 2016; HAZARIKA; THAKUR, 2020).

Apesar de estar presente em um grande número de ambientes no planeta, o filo Acidobacteria não tem, ainda, sua diversidade e funções ecológicas amplamente elucidadas (KIELAK *et al.*, 2016; LEE; KA; CHO, 2008). No presente estudo, membros deste filo representaram 6.88% da abundância relativa da comunidade microbiana presente nos solos estudados, sendo o terceiro filo mais abundante. Em solos de florestas, este grupo de microrganismos está presente como um dos mais abundantes (JANSSEN *et al.*, 2002; KIELAK *et al.*, 2016; NAVARRETE *et al.*, 2013) e é responsável por diversas funções, como o metabolismo de carboidratos (degradando diversos tipos de polissacarídeos) (KIELAK *et al.*, 2016), de nitrogênio (atuando, por exemplo, na redução de nitrito e de nitrato) (KIELAK *et al.*, 2016; WARD *et al.*, 2009) e na produção de transportadores celulares (WARD *et al.*, 2009).

Portanto, os filos Proteobacteria, Actinobacteria e Acidobacteria são de absoluta importância para os solos de florestas, desempenhando papéis fundamentais na ciclagem de nutrientes, na decomposição da matéria orgânica e na promoção do crescimento de plantas, podendo ser utilizados, também, como parâmetros indicadores de saúde do solo.

Em relação às comunidades de fungos nos solos, a prevalência do filo Ascomycota é uma situação comumente encontrada em diferentes solos (EGIDI *et al.*, 2019; TEDERSOO *et al.*, 2014). Membros deste filo são conhecidos por sua capacidade de decompor uma ampla gama de compostos orgânicos, incluindo lignina e celulose (CHALLACOMBE *et al.*, 2019). Além disso, algumas espécies de Ascomycota podem formar relações simbióticas com plantas, fornecendo serviços importantes, como a aquisição de nutrientes e a supressão de doenças (CHALLACOMBE *et al.*, 2019; SOUDZILOVSKAIA *et al.*, 2015; TEDERSOO *et al.*, 2012). Ainda, fungos a este filo podem desempenhar um importante papel na mobilização de minerais essenciais, incluindo fósforo e nitrogênio, tornando-os importantes contribuintes para o ciclo geral de nutrientes no solo (MUNEER *et al.*, 2021; RAYA-DÍAZ *et al.*, 2017).

O domínio Archaea engloba organismos que desempenham funções essenciais nos solos, estando principalmente relacionados aos ciclos do carbono, do nitrogênio e a mecanismos ligados à metanogênese e metanotrofia (ARAUJO *et al.*, 2018; CABELLO; ROLDÁN; MORENO-VIVIÁN, 2004; SPANG; ETTEMA, 2017). Nos solos avaliados neste estudo, os filos Euryarchaeota, Crenarchaeota e Thaumarchaeota foram classificados como os mais abundantes. Estes resultados estão de acordo com o relatado na literatura para solos, inclusive para áreas de Cerrado (ANGEL *et al.*, 2010; BATES *et al.*, 2011; PROCÓPIO; BARRETO,

2021). Souza *et al.* (2016) em estudo realizado na região central do Brasil, relataram que a abundância de indivíduos pertencentes ao filo Thaumarchaeota aumentou na estação chuvosa, sendo, inclusive, o filo de arqueia mais abundante no solo. Tendo em vista que no presente estudo o solo para as análises foi coletado no mês de novembro, período considerado chuvoso para a região, o filo Thaumarchaeota foi menos abundante do que os filamentos Euryarchaeota e Crenarchaeota, principalmente no solo coletado na área de Cerrado. A não observância dos padrões relatados na literatura pode ser explicada pela fitofisionomia de Cerrado em que as áreas se encontram. Souza e colaboradores (2016) amostraram solo em uma região de Cerrado *sensu stricto*, enquanto neste estudo o solo foi amostrado em uma área com fisionomia florestal (cerradão).

A substituição da abundância de Thaumarchaeota por Euryarchaeota nos solos da área de Cerrado pode ter sido influenciada pelas características do solo. Em geral, Thaumarchaeota é um filo de arqueias conhecido por desempenhar um papel fundamental no ciclo do nitrogênio (LU; SEURADGE; NEUFELD, 2017). Especificamente, membros deste filo estão envolvidos no processo de oxidação da amônia, que é um passo crítico na conversão do nitrogênio da atmosfera em formas que podem ser utilizadas por plantas e outros organismos (LU; SEURADGE; NEUFELD, 2017; PESTER; SCHLEPER; WAGNER, 2011). Nos ecossistemas do solo, alguns grupos metanogênicos de Euryarchaeota desempenham um papel importante no ciclo do carbono, decompondo matéria orgânica e liberando metano como subproduto (GONTIJO *et al.*, 2021; TUPINAMBÁ *et al.*, 2016).

O pH mais alto encontrado para o solo da área de Cerrado no presente estudo pode ter oferecido condições mais adequadas para as comunidades de arqueias se estabelecerem em maior abundância, uma vez que o pH pode influenciar comunidades de arqueias em solos sob fitofisionomias de Mata Atlântica e de Cerrado (ARAUJO *et al.*, 2018). Assim, considerando que o solo da área de Cerrado apresentou outras propriedades químicas distintas, como a menor disponibilidade de fósforo, ferro e manganês, os níveis de estresses ambientais podem ser maiores neste ambiente, o que tende a favorecer comunidades de arqueias (CABELLO; ROLDÁN; MORENO-VIVIÁN, 2004; LU; SEURADGE; NEUFELD, 2017). Dessa forma, considerando que as comunidades de arqueias são influenciadas por fatores ambientais como o pH, a umidade do solo (LU; SEURADGE; NEUFELD, 2017; NICOL *et al.*, 2008; STRES *et al.*, 2008) e a temperatura do ambiente (AVRAHAMI; CONRAD, 2003; STRES *et al.*, 2008), as diferenças encontradas para as comunidades de arqueias entre os solos da área de Cerrado e das áreas de Mata Atlântica e de ecótono podem estar relacionadas a estes fatores ambientais.

A comunidade vegetal presente acima do solo é distinta entre as três áreas estudadas, apresentando indivíduos especialistas de Mata Atlântica, de Cerrado ou generalistas. Tendo em vista a influência que as plantas têm sobre o recrutamento, principalmente pela liberação de compostos químicos específicos por suas raízes, e, conseqüentemente, sobre a estruturação das comunidades microbianas associadas à rizosfera e ao solo ao redor (BALDRIAN, 2017; MENDES *et al.*, 2014; URBANOVÁ; ŠNAJDR; BALDRIAN, 2015; WALL *et al.*, 2019), as diferenças encontradas entre as comunidades microbianas dos solos da área de Mata Atlântica, de ecótono e de Cerrado demonstram a importância e a atuação dos *feedbacks* entre as plantas e os solos (considerando suas porções físicas, químicas e biológicas) na estruturação das comunidades presentes acima e abaixo do solo (BENNET; KLIRONOMOS, 2019; VAN DER PUTTEN *et al.*, 2013). Considerando, portanto, os resultados obtidos neste estudo para a composição e a diversidade das comunidades microbianas, a primeira hipótese deste estudo, na qual era esperado que as comunidades de microrganismos dos solos apresentariam composição e diversidade distintas, foi parcialmente confirmada, uma vez que a composição de comunidades específicas, como a de arqueias, diferiu entre pelo menos uma das áreas. Porém, contrariando o que era esperado inicialmente, a diversidade não foi maior para os solos da área de Mata Atlântica.

6.3. Estrutura da comunidade microbiana

A análise de redundância demonstrou que a estrutura das comunidades microbianas é diferente entre as áreas e tem relação com características químicas, como as quantidades de ferro e manganês, e de atividade enzimática dos solos. O ferro é um elemento essencial para as plantas, tendo funções no transporte de oxigênio, na síntese de clorofila e atua como cofator para um grande número de enzimas (JIN; YE; ZHENG, 2014; MIMMO *et al.*, 2014). Através de exsudatos, as plantas podem moldar as comunidades de microrganismos para que estas promovam melhores condições para a aquisição de ferro, por exemplo, através da produção de sideróforos e da geração de prótons (que aumentam a solubilidade do ferro no solo) (CARRILLO-CASTAÑEDA *et al.*, 2005; LEMANCEAU *et al.*, 2009), e da produção de hormônios (que sinalizam para as plantas a deficiência de ferro no solo) (ZHANG *et al.*, 2009). O manganês é considerado um micronutriente importante para as plantas, estando relacionado à síntese da clorofila, na oxidação da água para gerar ATP e atua como cofator para diversas outras enzimas atuantes no processo fotossintético (HE *et al.*, 2021; NONG *et al.*, 2023). Em situações de baixa concentração de manganês nas plantas, os exsudatos liberados na rizosfera

podem atuar como indicadores para a redução do manganês presente no solo e a sua consequente disponibilização para as plantas, principalmente em ambientes com baixa disponibilidade de fósforo (LAMBERS *et al.*, 2021; POSTA; MARSCHNER; ROMHELD, 1994). Assim, considerando a importância de parâmetros químicos e biogeoquímicos, bem como as suas relações com as comunidades presentes nas áreas, as interações entre as espécies vegetais e os grupos de microrganismos, influenciadas por parâmetros abióticos do solo, moldam as distintas comunidades microbianas no solo das três áreas, o que confirma a segunda hipótese deste estudo.

A análise de abundância diferencial demonstrou que todos os gêneros mais abundantes nos solos coletados na área de Mata Atlântica pertencem ao filo Actinobacteria, ao qual fazem parte alguns gêneros diferencialmente mais abundantes neste solo, como *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Frankia*, *Salinispora* e *Micromonospora*, que são comumente encontrados em solos e podem atuar em simbiose com plantas (BARKA *et al.*, 2016). Assim, considerando a ampla gama de funções benéficas desempenhadas por actinobactérias, a sua abundância diferencial nos solos de Mata Atlântica estudados pode indicar uma comunidade mais estável e especializada neste ambiente, padrão também indicado pelas análises de correlação baseadas em taxonomia, acessadas através das *networks*. Utilizando essas análises, também foi observado que a comunidade microbiana presente no solo da área de Mata Atlântica é mais complexa e equilibrada do que as comunidades das outras duas áreas. Ainda, considerando a taxa de correlações positivas e negativas, observamos que o solo de Mata Atlântica apresenta proporção semelhante destas correlações, o que torna a comunidade microbiana do solo mais resiliente frente a possíveis distúrbios. As comunidades presentes nos solos coletado na área de ecótono e de Cerrado apresentam maiores taxas de correlações positivas entre os táxons, o que indica um maior nível de interdependência das espécies. Assim, caso haja algum distúrbio no ambiente que cause a redução ou o aumento de grupos microbianos específicos, os demais grupos que se relacionam serão afetados da mesma forma. Assim, a maior interdependência entre os grupos e a menor complexidade das comunidades, indicam ambientes menos complexos e resilientes, o que pode estar relacionado à substituição de espécies vegetais especialistas de Cerrado na área estudada (FRANCISCO, 2020).

6.4. Potencial perfil funcional das comunidades de microrganismos do solo

É necessário destacar que, através do sequenciamento metagenômico, foram acessadas as sequências de genes presentes nas amostras de solo, mesmo que estes não estivessem ativos no momento. Portanto, as funções são tratadas como potenciais.

Considerando que, ao longo do processo evolutivo, diferentes grupos de microrganismos desenvolveram a capacidade de exercer funções básicas semelhantes (JIA; WHALEN, 2020), a maioria das funções metabólicas encontradas hoje no solo pode ser realizada por inúmeros táxons diferentes (LOUCA *et al.*, 2018). Assim, funções consideradas comuns (como a ciclagem de fósforo de nitrogênio) são realizadas por uma ampla gama de microrganismos filogeneticamente distintos, enquanto funções raras (como a metanogênese e a metanotrofia) são realizadas por táxons especializados (JIA; WHALEN, 2020). No presente estudo, não foram encontradas diferenças significativas de potenciais funções entre as diferentes áreas e profundidades, indicando que, apesar das diferenças pontuais na composição taxonômica, as funções potenciais estão presentes de forma semelhante nas comunidades de microrganismos do solo das três áreas devido, provavelmente, a uma alta redundância funcional.

7. CONCLUSÕES

Os solos das três áreas e duas profundidades não diferem quanto a diversidade alfa, porém, a estrutura das comunidades microbianas é modulada pela diversidade beta.

A composição das comunidades e a abundância relativa é semelhante para bactérias e fungos nos solos das três áreas. Porém, a abundância relativa de arqueias aumenta no gradiente Mata Atlântica-Cerrado, sendo maior nos solos da área de Cerrado. Ainda, nestes mesmos solos, a composição da comunidade de arqueias é distinta das demais áreas, com indivíduos pertencentes ao filo Thaumarchaeota sendo substituídos por organismos do filo Euryarchaeota.

A estrutura das comunidades microbianas presentes nos solos das áreas de Mata Atlântica, ecótono e Cerrado é diferente e possui relação com fatores abióticos presentes no ambiente. Ainda, a comunidade de microrganismos do solo da área de Mata Atlântica é mais complexa e resiliente, principalmente do que a comunidade presente no solo da área de Cerrado.

REFERÊNCIAS

- ALVES, R. D. M. *et al.* Molecular markers for detection of species from the soil microbiota of the Brazilian Cerrado. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 12, p. 100926-100936, 2020.
- ANGEL, R. *et al.* Biogeography of soil archaea and bacteria along a steep precipitation gradient. **ISME Journal**, v. 4, n. 4, p. 553–563, abr. 2010.
- APPRILL, A. *et al.* Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 75, n. 2, p. 129-137, 2015.
- ARAÚJO, A. S. F. *et al.* Distinct bacterial communities across a gradient of vegetation from a preserved Brazilian Cerrado. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 110, p. 456-469, 2017.
- ARAÚJO, A. S. F. *et al.* Archaea diversity in vegetation gradients from the Brazilian Cerrado. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 522–528, 2018a.
- ARAÚJO, A. S. F. *et al.* Protist species richness and soil microbiome complexity increase towards clímax vegetation in the Brazilian Cerrado. **Communications Biology**, v. 1, n. 135, 8p., 2018b.
- AVRAHAMI, S.; CONRAD, R. Patterns of Community Change among Ammonia Oxidizers in Meadow Soils upon Long-Term Incubation at Different Temperatures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 10, p. 6152–6164, out. 2003.
- BALDRIAN, P. Forest microbiome: Diversity, complexity and dynamics. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 2, p. 109–130, 2017.
- BARKA, E. A. *et al.* Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 1, p. 1–43, mar. 2016.
- BARLOW, J. *et al.* Litter fall and decomposition in primary, secondary and plantation forests in the Brazilian Amazon. **Forest Ecology and Management**, v. 247, n. 1–3, p. 91–97, 2007.
- BARROS OZÓRIO, J. M. *et al.* Estoque de carbono e agregação do solo sob fragmentos florestais nos biomas mata atlântica e cerrado. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais (Online)**, n. 53, p. 97–116, 3 fev. 2020.
- BASTIAN M.; HEYMANN S.; JACOMY M. Gephi: an open source software for exploring and manipulating networks. *In: INTERNATIONAL AAAI CONFERENCE ON WEBLOGS AND SOCIAL MEDIA*, 3., 2009, San Jose, California, USA. **Proceedings...** Washington, DC: Association for the Advancement of Artificial Intelligence, 1999.
- BATES, S. T. *et al.* Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. **ISME Journal**, v. 5, n. 5, p. 908–917, maio 2011.
- BENNET, J. A.; KLIRONOMOS, J. Mechanisms of plant-soil feedback: interactions among biotic and abiotic drivers. **New Phytologist**, v. 222, p. 91-96, 2019.
- BRODY, J. R.; KERN, S. E. Sodium boric acid: atriz-less, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **BioTechniques**, v. 36, p. 214-216, 2004.
- CABELLO, P.; ROLDÁN, M. D.; MORENO-VIVIÁN, C. Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea. **Microbiology**, v.150, n. 11, p. 3527-3546, nov. 2004.

CAMERON, E. K. *et al.* Global gaps in soil biodiversity data Europe PMC Funders Group. **Nature Ecology and Evolution**, v. 2, n. 7, p. 1042–1043, 2018. Available in: <<https://www.ipbes.net/deliverables/2c-global-assessment>>.

CAMPANILI, M.; SCHAFFER, W. B. **Mata Atlântica: patrimônio nacional dos brasileiros**. 1 ed. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, 2010. 408 p.

CARRILLO-CASTAÑEDA, G. *et al.* Modulation of uptake and translocation of iron and copper from root to shoot in common bean by siderophore-producing microorganisms. **Journal of Plant Nutrition**, v. 28, n. 10, p. 1853–1865, 2005.

CHALLACOMBE, J. F. *et al.* Genomes and secretomes of Ascomycota fungi reveal diverse functions in plant biomass decomposition and pathogenesis. **BMC Genomics**, v. 20, n. 1, art. 976, 12 dez. 2019.

CHI LIU, Y. C.; XIANGZHEN, L.; MINJIE, Y. 2021. Microeco: an R package for data mining in microbial community ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 97, n. 2, art. fiae255, 2021. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae255>

COUTINHO, L.M. O conceito de cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, v.1, n.1, p. 17-23, 1978.

CUNHA, A. de M.; FONTES, M. P. F.; LANI, J. L. Mineralogical and chemical attributes of soils from the Brazilian Atlantic forest domain. **Scientia Agricola**, v. 76, n. 1, p. 82–92, 1 jan. 2019.

DAI, Z.; SU, W. *et al.* Long-term nitrogen fertilization decreases bacterial diversity and favors the growth of Actinobacteria and Proteobacteria in agro-ecosystems across the globe. **Global Change Biology**, v. 24, n. 8, p. 3452–3461, 1 ago. 2018.

DALAL, R. C. Soil microbial biomass – what do the numbers really mean? **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 38, p. 649-665, 1998.

DE LONG, J. R. *et al.* Why are plant-soil feedbacks so unpredictable, and what to do about it? **Functional Ecology**, v. 33, n. 1, p. 118-128, 2019.

DELGADO-BAQUERIZO, M. *et al.* Microbial richness and composition independently drive soil multifunctionality. **Functional Ecology**, v. 31, n. 12, p. 2330–2343, 1 dez. 2017.

DELMONT, T. O. *et al.* Accessing the soil metagenome for studies of microbial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 4, p. 1315–1324, 2011.

DILLY, O. *et al.* Bacterial Diversity in Agricultural Soils during Litter Decomposition. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 468–474, 2004.

DURIGAN, G. *et al.* A flora arbusto-arbustiva do Médio Paranapanema: Base para a restauração de ecossistemas naturais. In: VILAS BÔAS, O.; DURIGAN, G. (eds.). **Pesquisas em conservação e recuperação ambiental no Oeste Paulista: resultados da cooperação Brasil/Japão**. São Paulo: Páginas e Letras, 2004. p.199-239.

EIVAZI, F.; TABATABAI, M.A. Glucosidases and galactosidases in soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v.20, n.5, p.601-606, 1988. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(88\)90141-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(88)90141-1).

EGIDI, E. *et al.* A few Ascomycota taxa dominate soil fungal communities worldwide. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, art. 2369, 1 dez. 2019.

ELBENDARY, A. A. *et al.* Isolation of antimicrobial producing Actinobacteria from soil samples. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 1, p. 44–46, 1 jan. 2018.

FERNANDES, A. D. *et al.* ANOVA-Like Differential Gene Expression Analysis of Single-Organism and Meta-RNA-Seq. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, e67019, 2013. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0067019>.

FIERER, N. *et al.* Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 109, n. 52, p. 21390–21395, 2012.

FIERER, N.; WOOD, S. A.; BUENO DE MESQUITA, C. P. How microbes can, and cannot, be used to assess soil health. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 153, art. 108111, 2021.

FRANCISCO, B. S. **Composição, estrutura e evolução temporal de um fragmento de cerrado no sudeste do Brasil**. 2020. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Bauru, 2020.

FRIEDMAN, J.; ALM, E. J. Inferring Correlation Networks from Genomic Survey Data. **PLoS Computational Biology**, v. 8, n. 9, e1002687, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002687>

GLOOR, G. B.; MACKLAIM, J. M.; FERNANDES, A. D. Displaying variation in large datasets: plotting a visual summary of effect sizes. **Journal of Computational and Graphical Statistics**, v. 25, p. 971–979, 2016. <https://doi.org/10.1080/10618600.2015.1131161>

GLOOR, G. B. *et al.* Microbiome datasets are compositional: And this is not optional. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, art. 2224, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.02224

GONTIJO, J. B. *et al.* Not just a methane source: Amazonian floodplain sediments harbour a high diversity of methanotrophs with different metabolic capabilities. **Molecular Ecology**, v. 30, n. 11, p. 2560–2572, 1 jun. 2021.

GREIG-SMITH, P. **Quantitative plant ecology**. 3.ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1983. 359 p.

GUERRA, C. A. *et al.* Blind spots in global soil biodiversity and ecosystem function research. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, art. 3870, 2020.

HAZARIKA, S. N.; THAKUR, D. Actinobacteria. In: AMARESAN, N. *et al.* (eds.). **Beneficial Microbes in Agro-Ecology: Bacteria and Fungi**. Amsterdam: Elsevier, 2020. p. 443–476.

HE, J. *et al.* Transport, functions, and interaction of calcium and manganese in plant organellar compartments. **Plant Physiology**, v. 187, n. 4, p. 1940–1972, 1 dez. 2021.

IDOWU, O. J. *et al.* Farmer-oriented assessment of soil quality using field, laboratory, and VNIR spectroscopy methods. **Plant and Soil**, v. 307, n. 1–2, p. 243–253, jun. 2008.

JANSSEN, P. H. *et al.* Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, and Verrucomicrobia. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2391–2396, 2002.

JANSSON, J. K.; HOFMOCKEL, K. S. The soil microbiome – from metagenomics to metaphenomics. **Current Opinion on Microbiology**, v. 43, p. 162–168, 2018.

- JIA, Y.; WHALEN, J. K. A new perspective on functional redundancy and phylogenetic niche conservatism in soil microbial communities. **Pedosphere**, v. 30, n. 1, p. 18–24, 1 fev. 2020.
- JIN, C. W.; YE, Y. Q.; ZHENG, S. J. An underground tale: Contribution of microbial activity to plant iron. **Annals of Botany**, v. 113, n. 1, p. 7-18, jan. 2014.
- JOLY, C. A.; METZGER, J. P.; TABARELLI, M. Experiences from the Brazilian Atlantic Forest: Ecological findings and conservation initiatives. **New Phytologist**, v. 204, n. 3, p. 459–473, 2014.
- KERSTERS, K. *et al.* Introduction to the Proteobacteria. In: DeLONG, E. F. *et al.* (eds.). **The Prokaryotes**. New York: Springer, 2006. p. 3–37.
- KIELAK, A. M. *et al.* The ecology of Acidobacteria: Moving beyond genes and genomes. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, art. 744, 2016.
- KIM, H. S. *et al.* Diversity and composition of soil Acidobacteria and Proteobacteria communities as a bacterial indicator of past land-use change from forest to farmland. **Science of the Total Environment**, v. 797, art. 148944, 25 nov. 2021.
- KLINDWORTH, A. *et al.* Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, e1, 2013. doi: 10.1093/nar/gks808. Epub 2012 Aug 28.
- KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, p. 147-155, 2005.
- KOEPPEN, W. **Climatología**: con un estudio de los climas de la Tierra. Mexico, DF: Fondo de Cultura Economica, 1948. 474 p.
- LAMBERS, H. *et al.* Leaf manganese concentrations as a tool to assess belowground plant functioning in phosphorus-impooverished environments. **Plant and Soil**, v. 461, n. 1–2, p. 43–61, 1 abr. 2021.
- LEE, S. H.; KA, J. O.; CHO, J. C. Members of the phylum Acidobacteria are dominant and metabolically active in rhizosphere soil. **FEMS Microbiology Letters**, v. 285, n. 2, p. 263–269, ago. 2008.
- LEMANCEAU, P. *et al.* Iron dynamics in the rhizosphere as a case study for analyzing interactions between soils, plants and microbes. **Plant and Soil**, v. 321, p. 513-535, 2009.
- LEMOES, R. C.; SANTOS, R. D. **Manuel de descrição e coleta de solo no campo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1996. 84 p.
- LIU, Y. X. *et al.* A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data. **Protein and Cell**, v. 12, n. 5, p. 315–330, 2021.
- LOUCA, S. *et al.* Function and functional redundancy in microbial systems. **Nature Ecology and Evolution**, v. 2, p. 936-943, 2018.
- LU, X.; SEURADGE, B. J.; NEUFELD, J. D. Biogeography of soil Thaumarchaeota in relation to soil depth and land usage. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 2, art. fiw246, 1 fev. 2017. doi: 10.1093/femsec/fiw246
- LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 63, p. 541-556, 2009.

- MARGALEF, O. *et al.* Global patterns of phosphatase activity in natural soils. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, art. 1337, 1 dez. 2017.
- MARGALEF, O. *et al.* The effect of global change on soil phosphatase activity. **Global Change Biology**, v. 27, n. 22, p. 5989–6003, 2021.
- MAŠÍNOVÁ, T. *et al.* Drivers of yeast community composition in the litter and soil of a temperate forest. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 2, art. fiw223, 2017. doi: 10.1093/femsec/fiw223
- MENDES, L. W. *et al.* Land-use system shapes soil bacterial communities in Southeastern Amazon region. **Applied Soil Ecology**, v. 95, p. 151–160, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.06.005>
- MENDES, M. S. *et al.* Look down—there is a gap—the need to include soil data in Atlantic Forest restoration. **Restoration Ecology**, v. 27, n. 2, p. 361–370, 1 mar. 2019.
- MENDES, L. W. *et al.* Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere. **ISME Journal**, v. 8, n. 8, p. 1577–1587, 2014.
- MEYER, F. *et al.* The metagenomics RAST server - A public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. **BMC Bioinformatics**, v. 9, p. 1–8, art. 386, 2008.
- MIMMO, T. *et al.* Rhizospheric organic compounds in the soil-microorganism-plant system: their role in iron availability. **European Journal of Soil Science**, v. 65, n. 5, p. 629–642, 2014.
- MOORHEAD, D. L.; SINSABAUGH, R. L. A theoretical model of litter decay and microbial interaction. **Ecological Monographs**, v. 76, n. 2, p. 151–174, 2006.
- MUNEER, M. A. *et al.* Response of fungal diversity, community composition, and functions to nutrients management in red soil. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 7, art. 554, 1 jul. 2021.
- MYERS, N. *et al.* Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853–858, 2000.
- NAVARRETE, A. A. *et al.* Acidobacterial community responses to agricultural management of soybean in Amazon forest soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 83, n. 3, p. 607–621, mar. 2013.
- NDAW, S. M. *et al.* Relationships between bacterial diversity, microbial biomass, and litter quality in soils under different plant covers in northern Rio de Janeiro State, Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 55, n. 9, p. 1089–1095, 2009.
- NESME, J. *et al.* Back to the future of soil metagenomics. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–5, art. 73, 2016.
- NICOL, G. W. *et al.* The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 2966–2978, nov. 2008.
- NONG, H. *et al.* Woody plants have the advantages in the phytoremediation process of manganese ore with the help of microorganisms. **Science of the Total Environment**, v. 863, art. 160995, 10 mar. 2023.
- O'LEARY N.A. *et al.* Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D733–D745, 2016.

OLIVEIRA, P. E. A. M. de. Fenologia e biologia reprodutiva das espécies de Cerrado. *In*: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. (eds.). **Cerrado: ecologia e flora**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. cap. 9, p. 273-290.

OVERBEEK R. *et al.* The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 17, p. 5691-702, 2005. doi: 10.1093/nar/gki866. PMID: 16214803.

PARADA, A. E.; NEEDHAM, D. M.; FUHRMAN, J.A. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 1403-1414, 2016.

PARKS, D. H. *et al.* STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. **Bioinformatics**, v. 20, n. 21, p. 3123-3124, 2014.

PESTER, M.; SCHLEPER, C.; WAGNER, M. The Thaumarchaeota: An emerging view of their phylogeny and ecophysiology. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 300–306, jun. 2011.

POSTA, K.; MARSCHNER, H.; ROMHELD, V. Manganese reduction in the rhizosphere of mycorrhizal and nonmycorrhizal maize. **Mycorrhiza**, v. 5, p. 119-124, 1994.

POWERS, J. S.; MARÍN-SPIOTTA, E. Ecosystem Processes and Biogeochemical Cycles in Secondary Tropical Forest Succession. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 48, p. 497-519, 2017. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110316-022944>

PRESCOTT, C. E.; GRAYSTON, S. J. Tree species influence on microbial communities in litter and soil: Current knowledge and research needs. **Forest Ecology and Management**, v. 309, p. 19–27, 2013.

PROCÓPIO, L.; BARRETO, C. The soil microbiomes of the Brazilian Cerrado. **Journal of Soils and Sediments**, v. 21, p. 2327-2342, 2021.

PY-DANIEL, K. P. **Atividades amilíticas identificadas em bibliotecas metagenômicas da microbiota do solo do Cerrado**. 2010. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2010.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing [Internet]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2022. Disponível em: <http://www.R-project.org>

RAYA-DÍAZ, S. *et al.* Redefining the dose of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* (Ascomycota, Hypocreales) to increase Fe bioavailability and promote plant growth in calcareous and sandy soils. **Plant and Soil**, v. 418, n. 1–2, p. 387–404, 1 set. 2017.

REZENDE, C. L. *et al.* From hotspot to hopespot: An opportunity for the Brazilian Atlantic Forest. **Perspectives in Ecology and Conservation**, v. 16, n. 4, p. 208–214, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.pecon.2018.10.002>.

RICKLEFS, R. E; RELYEA, R. **A economia da natureza**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. 807 p.

SAFAR, N. V. H. *et al.* Atlantic Forest topsoil nutrients can be resistant to disturbance and forest clearing. **Biotropica**, v. 51, n. 3, p. 342–354, 1 maio 2019.

SAHEB KASHAF, S. et al. Recovering prokaryotic genomes from host-associated, short-read shotgun metagenomic sequencing data. **Nature Protocols**, v. 16, n. 5, p. 2520–2541, 2021.

SANTOS-ABERTURAS, J.; VIOR, N. M. Beyond Soil-Dwelling Actinobacteria: Fantastic Antibiotics and Where to Find Them. **Antibiotics**, v. 11, n. 2, p. 1-52, art. 195, 2022.

SÃO PAULO. Secretaria do Meio Ambiente/Instituto Florestal. **Inventário florestal da vegetação natural do estado de São Paulo**. São Paulo: Imprensa Oficial, 2005.

SÃO PAULO. Secretaria do Meio Ambiente/Instituto Florestal. **Inventário florestal da vegetação natural do estado de São Paulo: Mapeamento da cobertura vegetal nativa**. São Paulo: Imprensa Oficial, 2020.

SÃO PAULO. Resolução SMA 37. Dispõe sobre os procedimentos preparatórios para a criação do Mosaico de Unidades de Conservação do Cerrado Paulista, que abrange o Refúgio de Vida Silvestre Aimorés e Área de Relevante Interesse Ecológico - ARIE Leopoldo Coutinho, localizados nos Municípios de Agudos, Bauru e Pederneiras – SP. **Diário Oficial do Estado de São Paulo – Meio Ambiente**, São Paulo, 04 abr. 2018.

SFAIR, J. C. *et al.* Nested liana-tree network in three distinct neotropical vegetation formations. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 12, n. 4, p. 277-281, 2010.

SOUDZILOVSKAIA, N. A *et al.* Global patterns of plant root colonization intensity by mycorrhizal fungi explained by climate and soil chemistry. **Global Ecology and Biogeography**, v. 24, n. 3, p. 371–382, 1 mar. 2015.

SOUZA, R. C. *et al.* Shifts in taxonomic and functional microbial diversity with agriculture: How fragile is the Brazilian Cerrado? **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, art. 42, 2016.

SPAIN, A. M.; KRUMHOLZ, L. R.; ELSHAHED, M. S. Abundance, composition, diversity and novelty of soil Proteobacteria. **ISME Journal**, v. 3, n. 8, p. 992–1000, ago. 2009.

SPANG, A.; ETTEMA, T. J. G. Archaeal evolution: The methanogenic roots of Archaea. **Nature Microbiology**, v. 2, p. 1-2, 25 jul. 2017.

STAHL, D.A.; AMMAN, R.A. Development and Application of Nucleic Acid Probes in Bacterial Systematics. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. Chichester: John Wiley & Sons, 1991. p. 205-248.

STRASSBURG, B. B. N. et al. Moment of truth for the Cerrado hotspot. **Nature Ecology and Evolution**, v. 1, n. 4, p. 1–3, 2017. <http://dx.doi.org/10.1038/s41559-017-0099>

STRES, B. *et al.* Influence of temperature and soil water content on bacterial, archaeal and denitrifying microbial communities in drained fen grassland soil microcosms. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 66, n. 1, p. 110–122, 2008.

ŠTURSOVÁ, M. *et al.* Cellulose utilization in forest litter and soil: Identification of bacterial and fungal decomposers. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 80, n. 3, p. 735–746, 2012.

TABARELLI, M. *et al.* Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 132-138, 2005.

- TABATABAI, M.A. Enzymes. In: WEAVER, R.W. *et al.* (eds.). **Methods of soil analysis: microbial and biochemical properties**. Madison: Soil Science Society of America, 1994. p. 775-833.
- TEDERSOO, L. *et al.* Global diversity and geography of soil fungi. **Science**, v. 346, n. 6213, art. 1256688, 28 nov. 2014.
- TEDERSOO, L. *et al.* Towards global patterns in the diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 17, p. 4160–4170, set. 2012.
- TEIXEIRA, P. C. *et al.* **Manual de métodos de análise de solo**. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2017.
- TUPINAMBÁ, D. D. *et al.* Archaeal community changes associated with cultivation of Amazon forest soil with oil palm. **Archaea**, v. 2016, art. 3762159, 2016.
- UNITED NATIONS. **UN Decade on Ecosystem Restoration (2021–2030)**. Geneva, SZ, 2019. AG Index: A/RES/73/284, 06 de março de 2019. Disponível em: <<https://undocs.org/A/RES/73/284>>.
- 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 and Biochemistry**, v. 84, p. 53–64, 2015.
- VAN DER PUTTEN, W. H. *et al.* Plant-soil feedbacks: the past, the present and future challenges. **Journal of Ecology**, v. 101, p. 265-276, 2013.
- VAN DER PUTTEN, W. H. *et al.* Where, when, and how plant-soil feedback matters in a changing world. **Functional Ecology**, v. 30, n. 7, p. 1109-1121, 2016.
- VAN RAIJ, B. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônômico de Campinas, 2001.
- VENTURINI, A. M. *et al.* Resolved metagenomics reveals novel archaeal and bacterial genomes from Amazonian forest and pasture soils. **Microbial Genomics**, v. 8, n. 7, art. 853, 2022. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000853>
- VESTERGAARD, G. *et al.* Making big data smart—how to use metagenomics to understand soil quality. **Biology and Fertility of Soils**, v. 53, n. 5, p. 479–484, 2017.
- WALL, L. G. *et al.* Changes of paradigms in agriculture soil microbiology and new challenges in microbial ecology. **Acta Oecologica**, v. 95, p. 68-73, 2019.
- WARD, N. L. *et al.* Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 7, p. 2046–2056, abr. 2009.
- WEI, H. *et al.* Contrasting Soil Bacterial Community, Diversity, and Function in Two Forests in China. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, art. 1693, 29 mar. 2018.
- WHITE, T. J. *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. *et al.* (eds.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic Press, 1990. p. 315–322.

WEISER, V. de L. **Árvores, arbustos e trepadeiras do cerrado do Jardim Botânico Municipal de Bauru, SP**. 2007. Tese (Doutorado) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

XU, Z. *et al.* Bioinformatic approaches reveal metagenomic characterization of soil microbial community. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, e93445, 2014.

ZHANG, H. *et al.* A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deficiency-inducible mechanisms. **Plant Journal**, v. 58, n. 4, p. 568–577, maio 2009.

ZHANG J. *et al.* PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. **Bioinformatics**, v. 30, p. 614–620, 2014.

ANEXO

Anexo A – Lista florística das espécies vegetais arbóreas encontradas na parcela considerada como de Mata Atlântica

Tabela 1 – Lista florística contendo os indivíduos presente nas três parcelas onde os solos foram coletados.

Família	Espécie	Vegetação	Parcela de ocorrência
Annonaceae	<i>Annona cacans</i> Warm.	MA	ECO
Annonaceae	<i>Xylopia aromatica</i> (Lam.) Mart.	CE	CER
Apocynaceae	<i>Aspidosperma tomentosum</i> Mart.	CE	CER
Araliaceae	<i>Schefflera vinosa</i> (Cham. & Schtdl.) Frodin & Fiaschi	CE	CER, ECO
Burseraceae	<i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand	GEN	MAT, ECO
Calophyllaceae	<i>Kielmeyera coriacea</i> Mart.	CE	CER
Combretaceae	<i>Terminalia glabrescens</i> Mart.	CE	MAT, CER, ECO
Ebenaceae	<i>Diospyros hispida</i> A.DC.	CE	CER
Erythroxylaceae	<i>Erythroxylum subracemosum</i> Turcz.	GEN	MAT
Euphorbiaceae	<i>Actinostemon klotzschii</i> (Didr.) Pax	MA	MAT, ECO
Fabaceae	<i>Acosmium subelegans</i> (Mohlenbr.) Yakovlev	CE	CER
Fabaceae	<i>Anadenanthera peregrina</i> var. <i>falcata</i> (Benth.) Altschul	GEN	CER
Fabaceae	<i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.	GEN	MAT, ECO
Fabaceae	<i>Machaerium acutifolium</i> Vogel	CE	ECO
Fabaceae	<i>Plathymenia reticulata</i> Benth.	CE	MAT
Lauraceae	<i>Ocotea corymbosa</i> (Meisn.) Mez	GEN	CER
Lauraceae	<i>Ocotea pulchella</i> (Nees & Mart.) Mez	CE	CER, ECO
Melastomataceae	<i>Miconia albicans</i> (Sw.) Steud.	CE	CER
Melastomataceae	<i>Miconia stenostachya</i> DC.	CE	ECO
Myrtaceae	<i>Myrcia guianensis</i> (Aubl.) DC.	GEN	CER
Myrtaceae	<i>Myrcia multiflora</i> (Lam.) DC.	GEN	MAT, ECO
Myrtaceae	<i>Myrcia venulosa</i> DC.	CE	ECO
Nyctaginaceae	<i>Guapira opposita</i> (Vell.) Reitz	GEN	CER
Ochnaceae	<i>Ouratea spectabilis</i> (Mart. ex Engl.) Engl.	CE	CER
Peraceae	<i>Pera glabrata</i> (Schott) Poepp. ex Baill.	GEN	ECO
Polygonaceae	<i>Coccoloba mollis</i> Casar.	GEN	CER

Continuação

Primulaceae	<i>Rapanea umbellata</i> (Mart.) Mez	GEN	CER
Rubiaceae	<i>Amaioua intermedia</i> Mart. ex Schult. & Schult.f.	GEN	ECO
Rubiaceae	<i>Coussarea hydrangeifolia</i> (Benth.) Benth. & Hook.f. ex Müll.Arg.	GEN	MAT, CER, ECO
Rubiaceae	<i>Faramea montevidensis</i> (Cham. & Schltldl.) DC.	GEN	MAT, CER, ECO
Rubiaceae	<i>Ixora gardneriana</i> Benth.	MA	MAT, ECO
Rubiaceae	<i>Rudgea jasminoides</i> (Cham.) Müll.Arg.	MA	MAT, ECO
Rubiaceae	<i>Rudgea viburnoides</i> (Cham.) Benth.	CE	CER
Siparunaceae	<i>Siparuna guianensis</i> Aubl.	GEN	CER, ECO
Styracaceae	<i>Styrax camporum</i> Pohl	CE	CER
Symplocaceae	<i>Symplocos pubescens</i> Klotzsch ex Benth.	CE	CER
Vochysiaceae	<i>Qualea cordata</i> Spreng.	CE	ECO
Vochysiaceae	<i>Qualea grandiflora</i> Mart.	CE	CER
Vochysiaceae	<i>Qualea multiflora</i> Mart.	CE	CER
Vochysiaceae	<i>Qualea parviflora</i> Mart.	CE	CER
Vochysiaceae	<i>Vochysia cinnamomea</i> Pohl	CE	CER
Vochysiaceae	<i>Vochysia tucanorum</i> Mart.	CE	CER

MA: espécie especialista de Mata Atlântica. CE: espécie especialista de Cerrado. GEN: espécie generalista. MAT: Parcela considerada como de Mata Atlântica. CER: Parcela considerada como de Cerrado. ECO: Parcela considerada como de transição entre Mata Atlântica e Cerrado.

Fonte: autoria própria.