CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS
MESTRADO EM TECNOLOGIA DE PRODUTOS E PROCESSOS

Carla Alessandra Silva

ESTUDO DA DIVERSIDADE DE PROCARIOTOS EM AMOSTRAS DE SOLO DA SERRA DA PIEDADE/MG UTILIZANDO ABORDAGEM METATAXONÔMICA

BELO HORIZONTE
2023

Carla Alessandra Silva

ESTUDO DA DIVERSIDADE DE PROCARIOTOS EM AMOSTRAS DE SOLO DA SERRA DA PIEDADE/MG UTILIZANDO ABORDAGEM METATAXONÔMICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Produtos e Processos, do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Produtos e Processos.

Orientadora: Profª. Dra. Fernanda Badotti
Co-orientadora: Profª. Dra. Andréa Rodrigues

BELO HORIZONTE

2023

Silva, Carla Alessandra.
S586e Estudo da diversidade de procariotos em amostras de solo da serra da Piedade/MG utilizando abordagem metataxonômica / Carla Alessandra Silva. – 2023.
70 f. : il.
Orientadora: Fernanda Badotti.
Coorientadora: Andréa Rodrigues.
Dissertação (mestrado) – Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Produtos e Processos, Belo Horizonte, 2023.
Bibliografia.

1. DNA - Análise. 2. Solos - Classificação. 3. Solos - Propriedades físico-químicas. 4. Estrutura molecular. I. Badotti, Fernanda. II. Rodrigues, Andréa. III. Título.

CDD: 631.41

Ficha elaborada pela Biblioteca - *campus* Nova Suíça - CEFET-MG
Bibliotecária: Rosiane Maria Oliveira Gonçalves - CRB6-2660

CARLA ALESSANDRA SILVA

ESTUDO DA DIVERSIDADE DE PROCARIOTOS EM AMOSTRAS DE SOLO DA SERRA DA PIEDADE/MG UTILIZANDO ABORDAGEM METATAXONÔMICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Produtos e Processos, do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Produtos e Processos.

Belo Horizonte, 07 de dezembro de 2023.

Aprovada pela Banca Examinadora:

Dra. Fernanda Badotti

Dra. Andrea Rodrigues Marques

Dra. Fátima de Cássia Oliveira Gomes

Dr. Cleverson Fernando Garcia

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, por ter me dado à permissão de chegar até aqui, e por toda a força concedida na concretização desse sonho. Além disso, agradeço a Ele por todas as pessoas que cruzaram meu caminho, e que estiveram ao meu lado em todos os momentos.

À Mamãe e Papai que muitas vezes renunciaram aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus. Tudo que consegui só foi possível graças ao amor, apoio e dedicação que sempre tiveram por mim. Sempre me ensinaram agir com respeito, simplicidade, dignidade, honestidade e amor ao próximo.

À Andressa e William pela amizade, carinho e companheirismo; por estarem sempre torcendo pelas minhas conquistas.

Aos meus familiares e amigos, especialmente minhas primas Bárbara e Fernanda pelo apoio e incentivo incondicional.

Desejo igualmente agradecer a todos os meus amigos do CEFET-MG, especialmente a Viviane, cujo apoio e amizade estiveram presentes em todos os momentos.

Às minhas orientadoras, Fernanda e Andréa, pela paciência e apoio ao longo de toda a pesquisa. Suas orientações e insights foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Cleverson Garcia e Dra. Fátima de Cássia, por dedicarem seu tempo e fornecer valiosas sugestões e críticas construtivas.

Minha gratidão se estende à CEFET-MG, que proporcionou os recursos e o ambiente propício para a realização deste estudo.

Aos meus colegas, Andria e Glen, pelos momentos de colaboração, compartilhamento de ideias e apoio mútuo.

Aos professores Aristoteles Goés e Vasco Azevedo, cuja parceria tornaram este trabalho possível.

Enfim, agradeço a todos pelo carinho e por fazerem parte dessa grande conquista.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”. (Marthin Luther King)

RESUMO

A utilização de técnicas de sequenciamento de nova geração representam uma abordagem poderosa para investigar a diversidade microbiana do solo. O objetivo deste estudo foi analisar a diversidade taxonômica de procariotos em amostras de solo do Campo Rupestre Ferruginoso de uma área de ecossistema de canga da Serra da Piedade. Para isso, foi utilizada a técnica de sequenciamento *metataxonômica* associada ao marcador *16S rRNA*. O DNA das amostras foi extraído e sequenciado utilizando a plataforma *Illumina* no Laboratório Análise de Solos - Instituto Mineiro de Agropecuária (LASO - IMA) com intuito de associar as características químicas do solo com a microbiota do local. Os filos de bactérias que predominaram nas amostras foram Actinobacteriota (40,7%), Proteobacteria (21,79%), Acidobacteriota (12,5%) e Chloroflexi (11,73%). Além disso, os gêneros de maior abundância foram *Conexibacter* (17,28%), *Acidothermus* (15,39%) e *Bryobacter* (12,04%). O gênero *Conexibacter* possui uma notável capacidade de degradação de compostos orgânicos complexos, incluindo lignocelulose. Isso o torna uma fonte valiosa de enzimas envolvidas na degradação de biomassa vegetal. Os gêneros *Acidothermus* e *Bryobacter* apresentam resistência a condições extremas, como alta temperatura e baixo disponibilidade de nutrientes, além de deposição de matéria orgânica complexas. A análise química do solo revelou que os valores de pH em água indicam acidez elevada, o que pode estar relacionado aos altos níveis de Al^{3+}. Em solos ácidos, a liberação de íons de alumínio a partir de minerais presentes no solo é comum, tornando esses solos profundamente distróficos. A análise de componentes principais (PCA) foi realizada através matriz de dados composta por 18 variáveis e 18 amostras. A PCA das variáveis mostrou que levando em conta todos os atributos químicos analisados, as propriedades são semelhantes entre as amostras. Já PCA em nível de gênero, a análise não resultou na separação das amostras em grupos distintos, indicando ausência de diferenças entre as amostras. Desta forma a compreensão da diversidade microbiana do solo forneceu uma visão valiosa sobre a composição e a estrutura das comunidades de microrganismos nesse ecossistema único da Serra da Piedade/MG, demonstrando potencial biotecnológico desses microrganismos.

Palavras Chaves: Análise de DNA. Caracterização taxonômica. Abordagem Molecular. Solo Canga

ABSTRACT

The use of next-generation sequencing techniques represents a powerful approach to investigating soil microbial diversity. The objective of this study was to analyze the taxonomic diversity of prokaryotes in soil samples from Campo Rupestre Ferruginoso in a canga ecosystem area of Serra da Piedade. For this, the *metataxonomic* sequencing technique associated with the 16S rRNA marker was used. The DNA from the samples was extracted and sequenced using the *Illumina* platform at the Soil Analysis Laboratory - Instituto Mineiro de Agropecuária (LASO - IMA) with the aim of associating the chemical characteristics of the soil with the local microbiota. The bacterial phylum that predominated in the samples were Actinobacteriota (40.7%), Proteobacteria (21.79%), Acidobacteriota (12.5%) and Chloroflexi (11.73%). Furthermore, the most abundant genus was *Conexibacter* (17.28%), *Acidothermus* (15.39%) and *Bryobacter* (12.04%). The genus *Conexibacter* has a remarkable ability to degrade complex organic compounds, including lignocellulose. This makes it a valuable source of enzymes involved in the degradation of plant biomass. The genus *Acidothermus* and *Bryobacter* are resistant to extreme conditions, such as high temperature and low nutrient availability, in addition to the deposition of complex organic matter. Chemical analysis of the soil revealed that pH values in water indicate high acidity, which may be related to high levels of Al^{3+}. In acidic soils, the release of aluminum ions from minerals present in the soil is common, making these soils profoundly dystrophic. Principal component analysis (PCA) was performed using a data matrix consisting of 18 variables and 18 samples. The PCA of the variables showed that taking into account all the chemical attributes analyzed, the properties are similar between the samples. As for PCA at the genus level, the analysis did not result in the separation of the samples into distinct groups, indicating the absence of differences between the samples. In this way, understanding soil microbial diversity provided valuable insight into the composition and structure of microorganism communities in this unique ecosystem in Serra da Piedade/MG, demonstrating the biotechnological potential of these microorganisms.

Key words: DNA analysis. Taxonomic characterization. Molecular Approach. Soil Canga

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Metabolismo de procariontes – Ciclo Carbono e Nitrogênio 17

Figura 2: Couraças de canga..... 22

Figura 3: Visão de parte da Serra da Piedade, Caeté-MG – Campo rupestre sobre canga.....24

Figura 4: Regiões conservadas, variáveis e hipervariáveis dentro do gene 16S rRNA e os vários pares de primers usados para sequenciamento.....30

Figura 5: Esquema de validade de OTU's de novo, OTU's de referência fechada e ASV's.....33

Figura 6: Área de coletas das amostras.....39

Figura 7: Distribuição dos filos mais abundantes encontrados nas amostras do solo de canga.....45

Figura 8: Distribuição dos gêneros mais abundantes encontrados nas amostras do solo de canga.....47

Figura 9: Análise de componentes principais em nível de gênero dos microrganismos em amostras do solo de canga.....51

Figura 10: Distribuição da porcentagem de variabilidade explicada por componente principal..... 56

Figura 11: Representação dos escores das amostras e cargas fatoriais via PCA.....57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Vantagens e limitações dos métodos NGS usados em análise de micro bioma.....27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estatísticas do sequenciamento metataxonômico considerando todas as amostras coletadas na área do Monumento Natural Estadual Serra da Piedade..... 42-43

Tabela 2: Abundância Relativa (%) da abordagem amplicon 16S rRNA das amostras de solo de canga em nível de filo..... 43

Tabela 3: Abundância Relativa (%) da abordagem amplicon 16S rRNA das amostras de solo de canga em nível de gênero..... 43-44

Tabela 4: Alfa diversidade das amostras da área experimental do Monumento Natural Estadual Serra da Piedade em nível de filo.....49

Tabela 5: Alfa diversidade das amostras da área experimental do Monumento Natural Estadual Serra da Piedade em nível de gênero.....50

Tabela 6: Valores da matéria orgânica e fertilidade do solo de cada amostra da área experimental do Monumento Natural Estadual Serra da Piedade (MONAESP), Caeté, Minas Gerais..... 52

Tabela 7: Valores dos micronutrientes do solo de cada amostra da área experimental do Monumento Natural Estadual Serra da Piedade (MONAESP), Caeté, Minas Gerais.....53

Tabela 8: Valores fertilidade do solo de cada amostra da área experimental do Monumento Natural Estadual Serra da Piedade (MONAESP), Caeté, Minas Gerais..... 54-55

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

16S rRNA - Menor subunidade ribossomal

ASV - Variantes de Sequências de *Amplicons* (do inglês, *Amplicon* sequence variant)

CE - Condutividade Elétrica

CTC - Capacidade De Troca Catiônica

CTC – ef - Capacidade De Troca Catiônica Efetiva

CON/C - Convencional

DNA - Ácido desoxirribonucleico

FBN- Fixação Biológica de Nitrogênio

L- Litros

M – Molar

m – Saturação em Alumínio

Mg - Magnésio

min - minutos

mL – mililitro

MG – Minas Gerais

NGS - Sequenciamento de Nova Geração (do inglês, Next Generation Sequencing)

ORG/O - Orgânico

OTU - Unidade Taxonômica Operacional (do inglês, Operational Taxonomic Unit)

PGPM - Microrganismos Promotores (do inglês, Plant Growth-Promoting Microorganisms)
de Crescimento em Plantas

P - Fóforo

pb - Pares de bases

PCA - Análise do componente principal (do inglês, Principal Componente Analysis)

PCR - Reação da Polimerase em Cadeia (do inglês, Polimerase Chain Reaction)

pH - potencial hidrogeniônico

QF -Quadrilátero Ferrífero

R - Resistente

rRNA - RNA ribossomal

SB – Soma de bases

SES - Superfície Específica Do Solo

V%- Saturação por Base

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 12
2. OBJETIVOS 14
2.1 Objetivo Geral 14
2.2 Objetivos Específicos 14
3. REFERENCIAL TEÓRICO 15
3.1 Microrganismos do solo 15
3.1.1 Importância dos procariotos para o solo 17
3.1.2 Bactérias presentes no solo 19
3.2 Solos desenvolvidos sobre canga ferruginosa 21
3.3 Microrganismos e componentes químicos no solo canga 25
3.4 Metagenômica 27
3.4.1 Unidades taxonômicas operacionais (OTU's) e Variantes de Sequência amplicon (ASV's) 31
3.5 Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis* – PCA) 35
4. MATERIAIS E MÉTODOS 38
4.1 Área de estudo e coleta das amostras 38
4.2 Caracterização físico-química do solo 39
4.3 Extração e Sequenciamento de DNA 40
4.4 Bioinformática 40
4.5 Estatística 41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 42
5.1 Sequenciamento dos *amplicons* da região 42
5.2 Análise taxonômica 43
5.3 Índice de Diversidade 48
5.4 Análise de Componentes Principais dos Microrganismos 50
5.5 Caracterização físico-química do solo 51
5.5.1 Análise de Componentes Principais 55
5.6 Efeito da Composição Química do Solo na Diversidade Microbiana do solo de Cangas 58
6. CONCLUSÃO 59
REFERÊNCIAS 60

1. INTRODUÇÃO

O solo é um ecossistema complexo que é controlado principalmente pelas comunidades microbianas específicas de cada local. A composição, a diversidade e a função das comunidades microbianas do solo são reguladas pelo clima, métodos de cultivo de plantas, nutrientes do solo, patógenos e práticas de manejo agrícola. A maioria dos avanços alcançados em ecologia microbiana nas últimas décadas se baseia em progressos metodológicos que permitiram uma descrição precisa da composição e função da comunidade microbiana em seu ambiente particular (BHOWMIK et al., 2019).

Dada a importância do solo como fornecedor de nutrientes e água para diferentes ecossistemas, é necessário entender a saúde e a qualidade do ecossistema edáfico para sua preservação (ALVES, 2011).

Os microrganismos, por sua alta abundância e sua relação com a degradação da matéria orgânica e os ciclos biogeoquímicos, respondem rapidamente às mudanças ambientais e, portanto, são utilizados como bioindicadores da saúde do solo (ALARCÓN GUTIÉRREZ et al., 2021).

Localizados em altitudes acima de 900 m, especificamente na Serra do Espinhaço, as comunidades vegetais dos campos rupestres formam uma paisagem única, rica e endêmica (SILVA, 2020). Do ponto de vista ecológico, a dinâmica entre as comunidades que vivem nesses ambientes de alto estresse confere uma relação funcionalmente diversa devido a interação entre os seres vivos e os fatores abióticos (FELESTRINO et al., 2018). Estudos apontam grande diversidade microbiana em cavernas nos Campos Rupestres Ferruginosos do QF (PARKER et al., 2013, 2018; LEMES et al., 2021) e em formações da canga na Amazônia (MONTEIRO et al., 2023).

Contudo, estudos relatando a presença e a importância da microbiota no ambiente edáfico heterogêneo da canga ainda são incipientes. As comunidades de microrganismos no solo tem grande importância para desenvolvimento de métodos para recuperação de áreas degradadas e, ainda, tem muito potencial biotecnológico, podendo ser descoberto novos antibióticos, enzimas, drogas anticancerígenas, compostos antifúngicos, inibidores enzimáticos, agentes antiparasitários dentre outros (MENEGHINE, 2016; PESSOA FILHO, 2010).

Atualmente, as análises de metataxonômica tem revolucionado o entendimento da diversidade microbiana e têm um papel crucial para compreender as funções bioquímicas dos microrganismos sua interação com fatores bióticos, já que visa o estudo de materiais

genéticos podem ser avaliados diretamente a partir das amostras recuperadas do meio ambiente (BISWAS; SARKAR, 2018).

Esta abordagem revolucionou a realidade da pesquisa em microbiologia por possibilitar a análise de genomas tanto de microrganismos cultiváveis, como de microrganismos ainda não-cultiváveis em laboratório, possibilitando o isolamento de DNA a partir de amostras ambientais complexas (NESME, 2016; SIMON; DANIEL, 2011). As estimativas apontam que, aproximadamente, apenas 1% dos microrganismos presentes na natureza são passíveis de cultivo em condições laboratoriais (KUMAR 2015; TURNBAUGH; GORDON, 2008) deixando uma lacuna em seu conhecimento taxonômico e funcional. Esta técnica pode ser considerada uma das mais impactantes para determinar a saúde do solo, pois permite o conhecimento da biodiversidade, da estrutura da comunidade e das funções potenciais das comunidades microbianas de ambientes distintos (NESME, 2016).

Desta forma, é de extrema importância compreender o ecossistema edáfico da canga, utilizando-se de ferramentas que envolvam análises de metataxonômica, pois estas têm um papel crucial na classificação taxonômica dos microrganismos e sua interação com fatores bióticos propiciando o conhecimento acerca especificidade da biodiversidade do solo e melhorar a compreensão dos processos e serviços ecossistêmicos, permitindo ainda, conhecer microrganismos com alto potencial biotecnológico (BISWAS; SARKAR, 2018).

Especificamente delimitando o solo objeto de análise da presente pesquisa, é importante considerar que nas montanhas ferruginosas da Serra da Piedade padrões ambientais distintos podem ser observados, desde as chamadas ilhas florestais e áreas de formações vegetais mais abertas, caracterizando recortes que formam o complexo rupestre da região. Destaca-se que a diversidade vegetal nestas áreas é um dos aspectos que determina a disponibilidade e a composição de substâncias orgânicas liberadas no solo, refletindo, dessa maneira, na composição das comunidades de microrganismos (PEREIRA, 2012).

Desta forma, objetivou-se relacionar as análises físico-químicas do solo com sua metataxonômica para estabelecer a relação dos organismos com ambiente de campos rupestres ferruginosos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar a heterogeneidade físico-química e a diversidade taxonômica procariótica utilizando sequenciamento metataxonômico com marcador 16S rRNA de amostras do solo do Campo Rupestre Ferruginoso de uma área de ecossistema de canga na Serra da Piedade.

2.2 Objetivos Específicos

- Extrair DNA, amplificar a região 16S rRNA utilizando *primers* específicos e sequenciar os *amplicons*.
- Determinar a diversidade e a composição da comunidade de procariotos.
- Quantificar os atributos físico-químicos de fertilidade do solo, tais como: pH em água; Ca^{2+}, Mg^{2+} e Al^{3+} trocáveis; teores de P e K; capacidade de troca catiônica (CTC); soma de bases (SB) e matéria orgânica.
- Correlacionar com os atributos físico-químicos das amostras de solo de canga coletadas com as comunidades procariotas.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Microrganismos do solo

Existe um ecossistema complexo e dinâmico no solo, onde múltiplos organismos coexistem e interagem entre si, levando a diversas associações. O solo, constituído por material mineral (45%), água (20-30%), gases (20-30%) e matéria orgânica (1-5%) (MCCAULEY et al*.,* 2005), fornece diversos serviços ecossistêmicos, tais como: sustentabilidade social e ecológica; adaptação e mitigação das alterações climáticas; recurso biotecnológico para a humanidade; ciclagem de água e nutrientes e segurança alimentar (NELSON et al., 2013).

Minerais, matéria orgânica e microrganismos estão intimamente associados aos solos e interagem estreitamente nos processos ambientais. Essas interações são especialmente importantes na rizosfera do solo e na interface sedimento-água, onde os bioquímicos de baixo peso molecular são abundantes e a atividade microbiana é intensa (SCHINNER et al*.,* 2012).

Os microrganismos regulam as propriedades e a fertilidade do solo através de diferentes vias: os microrganismos podem ativar os nutrientes do solo e promover a sua disponibilidade; as bactérias fixadoras de nitrogênio melhoram a fertilidade do solo ao transformar os elementos de nitrogênio; as secreções extracelulares de microrganismos podem aumentar a estabilidade dos agregados do solo e aumentam o conteúdo de matéria orgânica do solo ao decompor resíduos vegetais e animais (ZHANG et al*.,* 2021).

No planeta Terra existe uma grande diversidade de solos e cada um possui uma biodiversidade específica. Os microrganismos do solo são classificados em sete categorias diferentes: vírus, bactérias, fungos, algas verdes azuladas, *Actinobactérias*, protozoários e nematoides. Cada um desses grupos possui características diferentes e seu papel no solo que habitam e, alguns desses microrganismos citados anteriormente, são encontrados não apenas na superfície do solo, mas também no solo subterrâneo (WANG et al*.,* 2021).

Os microrganismos constituem menos que 0,5% (m/m) da massa do solo, mas têm um grande impacto nas propriedades e processos do solo. Cerca de 60-80% do metabolismo total do solo é devido à microflora. Estes são os menores organismos (<0,1 mm) e são extremamente abundantes e diversos (BENNETT; CAHILL, 2016).

Geralmente, o número de microrganismos diminui com o aumento da profundidade no perfil do solo, principalmente devido à diminuição do conteúdo de matéria orgânica. A

composição e a distribuição da comunidade microbiana no solo podem mudar com as mudanças no ambiente de uma área para outra. A estreita região do solo sob a influência direta das raízes das plantas, chamada rizosfera, abriga mais microrganismos do que outras partes do solo (SCHINNER et al*.,* 2012).Os organismos do solo representam uma grande fração da biodiversidade terrestre global e eles podem ser agrupados com base no tamanho, espécie e função (GUPTA et al*.,* 2008).

Ivanova *et al* (2016) explicam que apenas 1g de solo pode conter centenas de milhões a milhares de milhões de microrganismos. Os autores destacam que os microrganismos mais numerosos no solo são as bactérias, também são amplamente encontrados os fungos. As Actinobactérias são bactérias que podem formar ramos como fungos. São os Actinobactérias que dão ao solo o seu cheiro característico de terra. Fungos e Actinobactérias são bons para iniciar a decomposição de resíduos orgânicos, trabalhando em materiais difíceis de decompor. As bactérias terminam o trabalho consumindo os ingredientes mais digeríveis (BHATTI et al*.,* 2017).

Segundo Kumar et al (2015), muitos outros microrganismos podem ser encontrados em menor número no solo, incluindo algas, cianobactérias (muitas vezes chamadas de algas verde-azuladas) e protozoários (organismos unicelulares que decompõem materiais orgânicos e consomem bactérias).

De acordo com Kumar et al (2015), os microrganismos têm uma estreita relação com a manutenção da boa estrutura do solo, o que promove a infiltração e drenagem da água, a aeração do solo e o crescimento e exploração vigorosos das raízes. Substâncias gomosas produzidas por microorganismos do solo (açúcares complexos e mucilagens) ajudam a cimentar as partículas do solo em agregados, que contribuem para a estrutura do solo. Os referidos autores mencionam que isso também torna os agregados menos propensos a se desintegrarem quando expostos à água.

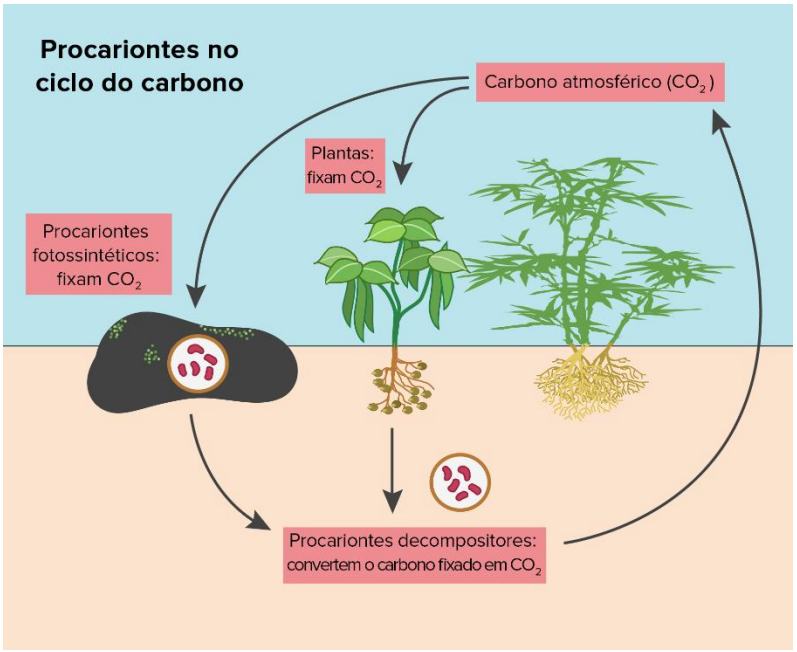
A proporção dos diferentes tipos de organismos presentes no solo depende de condições como umidade disponível, aeração, níveis de matéria orgânica e tipo de planta presente. Condições químicas como acidez e alcalinidade afetarão grandemente as populações de organismos do solo. Por exemplo, os fungos preferem frequentemente solos ácidos, enquanto os Actinobactérias prosperam em condições mais alcalinas (SCHINNER et al*.,* 2012).

3.1.1 Importância dos procariotos para o solo

É sabido que os procariotos são um componente essencial do subsistema de decomposição do solo, no qual os resíduos vegetais e animais são degradados em matéria orgânica e os nutrientes são liberados nas cadeias alimentares. Os procariontes são onipresentes: não existe nicho ou ecossistema em que eles não estejam contidos. Os procariontes desempenham muitos papéis nos ambientes que ocupam, mas as funções que desempenham nos ciclos do carbono e do nitrogênio são vitais para a vida na Terra. Esses microrganismos transformam a matéria orgânica em nutrientes que são assimilados pelas plantas e são responsáveis pela ciclagem de carbono, nitrogênio e outros nutrientes (AKARI; UCHIDA, 2021).

Uma representação do ciclo do carbono e nitrogênio é visto na Figura 1:

Figura 1: Metabolismo de procariontes – Ciclo Carbono e Nitrogênio



Fonte: adaptado de Akari e Uchida, 2021.

O ciclo do carbono e o ciclo do nitrogênio são dois processos que ocorrem nos ecossistemas. Ambos os processos estão envolvidos nas interações entre animais e coisas relacionadas à natureza. A principal diferença entre o ciclo do carbono e do nitrogênio é que o ciclo do carbono está envolvido na reciclagem do carbono, enquanto o ciclo do nitrogênio está envolvido na reciclagem do nitrogênio. Ambos os processos possuem múltiplas

maneiras de reciclar carbono e nitrogênio. Ambos os ciclos começam e terminam com gases. Como os ciclos do carbono e do nitrogênio funcionam simultaneamente, eles são frequentemente chamados de ciclo CNO (AKARI; UCHIDA, 2021).

Belda et al (2014), assinalam que os procariontes desempenham um papel importante no ciclo do carbono. O carbono circula pelos principais reservatórios da Terra: terra, atmosfera, ambientes aquáticos, sedimentos e rochas e biomassa. O movimento do carbono ocorre por meio do dióxido de carbono, que é removido da atmosfera pelas plantas terrestres e procariontes marinhos e retorna à atmosfera por meio da respiração de organismos quimioorganotróficos, incluindo procariontes, fungos e animais. Os autores reforçam que, embora o maior reservatório de carbono nos ecossistemas terrestres esteja nas rochas e nos sedimentos, esse carbono não está prontamente disponível.

Chen et al (2020), destacam que uma fonte muito significativa de compostos de carbono é o húmus, que é uma mistura de materiais orgânicos de plantas mortas e procariontes que resistiram à decomposição. Consumidores como os animais utilizam compostos orgânicos gerados pelos produtores, liberando dióxido de carbono para a atmosfera. Doyeni et al (2021), mencionam que o contribuinte mais importante de dióxido de carbono para a atmosfera é a decomposição microbiana de material morto (animais, plantas e húmus).

Akari e Uchida (2021) esclarecem que, em ambientes aquosos e seus sedimentos anóxicos, ocorre outro ciclo do carbono. Neste caso, o ciclo é baseado em compostos de um carbono. Em sedimentos anóxicos, os procariontes, principalmente archaea, produzem metano (CH_4). Esse metano se move para a zona acima do sedimento, que é mais rico em oxigênio e sustenta bactérias chamadas oxidantes de metano, que oxidam o metano em dióxido de carbono, que então retorna à atmosfera.

Dyoni et al (2021), ressaltam que o nitrogênio é um elemento muito importante para a vida porque faz parte de proteínas e ácidos nucléicos. Como um macronutriente na natureza, é reciclado de compostos orgânicos em amônia, íons de amônio, nitrato, nitrito e gás nitrogênio por uma miríade de processos, muitos dos quais são realizados exclusivamente por procariontes; eles são a chave para o ciclo do nitrogênio. O maior reservatório de nitrogênio disponível no ecossistema terrestre é o nitrogênio gasoso do ar, mas esse nitrogênio não é utilizável pelas plantas, que são produtores primários.

O azoto gasoso é transformado, ou “fixado”, em formas mais facilmente disponíveis, como o amoníaco, através do processo de fixação de azoto por meios naturais,

especialmente por microrganismos (procariotos) no solo (CHEN et al*.,* 2020). A amônia pode então ser usada pelas plantas ou convertida em outras formas que são realizados exclusivamente por procariontes; eles são a chave para o ciclo do nitrogênio.

Outra fonte de amônia é a amonificação, processo pelo qual a amônia é liberada durante a decomposição de compostos orgânicos contendo nitrogênio. A amônia liberada na atmosfera, entretanto, representa apenas 15% do nitrogênio total liberado; o resto é como N_2 e N_2O (AKARI; UCHIDA, 2021).

A amônia é catabolizada anaerobicamente por alguns procariontes, produzindo N_2 como produto. A nitrificação, de acordo com Belda et al (2014), é a conversão de amônio em nitrito e nitrato. A nitrificação nos solos é realizada por bactérias pertencentes aos gêneros *Nitrosomas*, *Nitrobacter* e *Nitrospira*. As bactérias realizam o processo inverso, a redução do nitrato dos solos a compostos gasosos como o N_2O, NO e N_2, um processo denominado desnitrificação.

Reavy, Swanson e Taliansky (2014) destacam que os microrganismos aumentam a aeração e a penetrabilidade; decompõem a matéria orgânica; criam húmus; fixam o nitrogênio e promovem o crescimento das plantas. Os microrganismos do solo são influenciados por fatores bióticos e abióticos, como cobertura vegetal ou parâmetros edáficos. O pH influencia fortemente as comunidades bacterianas do solo.

Nesse sentido, é valido lembrar o dizem Hermans et al (2016), que caracterizar o estado natural do bioma de um solo é uma tarefa bastante desafiadora. Além da sua enorme diversidade estrutural e funcional, os biomas do solo são influenciados por fortes dinâmicas temporais, incluindo condições climáticas sazonais e a enorme heterogeneidade espacial e os microrganismos presentes que varia da escala de campo à microescala. Todas essas propriedades intrínsecas dificultam a interpretação dos dados obtidos na análise dos biomas do solo e na mensuração de suas características funcionais.

3.1.2 Bactérias presentes no solo

As bactérias são os menores e mais numerosos organismos celulares nos solos e, como explicado por Fierer (2017), são organismos procarióticos que geralmente têm 0,5 a 1 mm de largura e 1 a 2 mm de comprimento. As minúsculas bactérias, denominadas ultramicrobactérias, podem ter apenas 0,3 mm de diâmetro e volumes celulares inferiores a 0,1 mm^3. Embora exista uma variedade de formatos de células para bactérias, incluindo

bastonetes, esféricos, espirais e filamentosos, o formato de célula mais comum encontrado no solo é um bastonete curto (bastonete cocóide). Considera-se para fins deste estudo, que serão discutidos apenas os microorganismos mais representativos do solo.

A biomassa bacteriana encontrada no solo varia de 300 a 3.000 kg/ha, a maioria delas (>99%) não foram ou não podem ser cultivadas em laboratório. De acordo com Kumar et al (2015), os gêneros bacterianos comuns isolados do solo incluem *Bacillus, Arthrobacter*, Pseudomonas, *Agrobacterium, Alcaligenes, Clostridium, Flavobacterium, Corynebacterium, Micrococcus, Xanthomonas* e *Mycobacterium*. Em contraste com a morfologia simples, as bactérias apresentam a maior diversidade metabólica.

Em termos de utilização de carbono, Gupta et al (2008) apontaram a existência de autotróficos e heterótrofos, e, em termos de consumo de energia, existem quimioorganotróficos, quimiolitotróficos e fototróficos. As bactérias aeróbicas usam oxigênio como aceptor de elétrons; bactérias anaeróbicas usam receptores de elétrons alternativos, como nitrato, ferro férrico, sulfato, carbonato e matéria orgânica.

Em solos encharcados ou fortemente compactados, o número de bactérias aeróbicas é reduzido, enquanto as bactérias microaerófilas e as anaeróbicas aumentam. Ao contrário de outros microrganismos do solo, a maioria das bactérias prefere solos ricos em nutrientes, com pH neutro ou ligeiramente alcalino e uma relação C/N próxima (SCHINNER et al., 2012).

Considerando os efeitos positivos das bactérias no solo, Neumann et al (2014) relataram que as bactérias são uma parte importante do componente biótico do solo, pois são responsáveis por inúmeras atividades fisiológicas que ocorrem no solo. As comunidades bacterianas do solo fornecem uma infinidade de serviços ecossistêmicos que afetam direta e indiretamente o funcionamento geral do ambiente do solo.

Hermans et al (2016), ressaltaram que muitas bactérias no solo produzem polissacarídeos ou glicoproteínas que formam uma camada na superfície das partículas do solo. Estas substâncias atuam assim como agentes cimentantes e melhoram a estrutura do solo. Os autores sustentaram que as bactérias fazem parte de diferentes ciclos biogeoquímicos, como o ciclo do nitrogênio e o ciclo do carbono, onde estão envolvidas na produção de muitos nutrientes para o solo e as plantas.

O processo de sucessão natural também é potencializado por bactérias que melhoram a qualidade do solo para que novas comunidades de plantas possam sobreviver. Além disso, as bactérias são importantes para a degradação enzimática das substâncias orgânicas complexas e do solo em nutrientes e para a liberação de nutrientes e

oligoelementos enzimáticos da fração mineral do solo. As comunidades bacterianas no solo atuam como indicadores das condições do solo (FIERER, 2017).

Já como efeitos negativos das bactérias no solo, Gupta et al (2008) detalharam que as bactérias patogênicas podem ter efeitos nocivos nas culturas, resultando em má saúde das culturas e rendimentos fracos, levando à perda das culturas. Sabe-se que algumas bactérias perturbam o equilíbrio ecológico do solo, o que resulta na infertilidade do solo e na diminuição da saúde do solo.

Além disso, Schinner et al (2012) relataram que as bactérias patogênicas encontradas no solo podem causar diversas formas de doenças nas plantas. A liberação de diferentes subprodutos pode alterar as propriedades químicas do solo, como pH, capacidade de troca catiônica e conteúdo de nutrientes.

3.2 Solos desenvolvidos sobre canga ferruginosa

O termo ‘canga’ refere-se a 2 a 3 metros da superfície horizontal, sendo dispostas em camadas, em que não se nota estratificação aparente, enriquecidas em sesquióxidos de ferro e alumínio, podendo ser duras ou não, presente em solos e sedimentos (PIERINI, 2006).

Um ecossistema edáfico particular são as crostas de canga couraçada, que podem atingir cerca de 30 m de espessura, e a sua constituição mineralógica pode chegar a 90% de óxido e hidróxido de ferro. Os solos desenvolvidos na canga – quando presentes – são ácidos e rasos, com um nível notavelmente alto de manganês e ferro, e um estado nutricional muito baixo, notavelmente com relação ao fósforo (JACOBI et al*.,* 2015).

Heterogeneidade edáfica na canga pode ser observada tanto na textura quanto na sua coloração, e apresentam grande diversidade de formas e estruturas, que podem ter diferentes espessuras e orientações, o que pode influenciar a sua permeabilidade e, consequentemente, a sua capacidade de retenção de água (DIAS, 2021; MARTINS, 2021).

Essa heterogeneidade estrutural da canga, representada por fraturas, depressões, poros e canais que se desenvolvem em direção ao interior rochoso, favorece o desenvolvimento radicular mesmo na ausência de solo (CARMO *et al*., 2016). Sob as cangas lateríticas e quartzitos ferruginosas, no Quadrilátero Ferrífero (QF), estão os Campos Rupestres Ferruginosos (MIOLA; RAMOS; SILVEIRA, 2021).

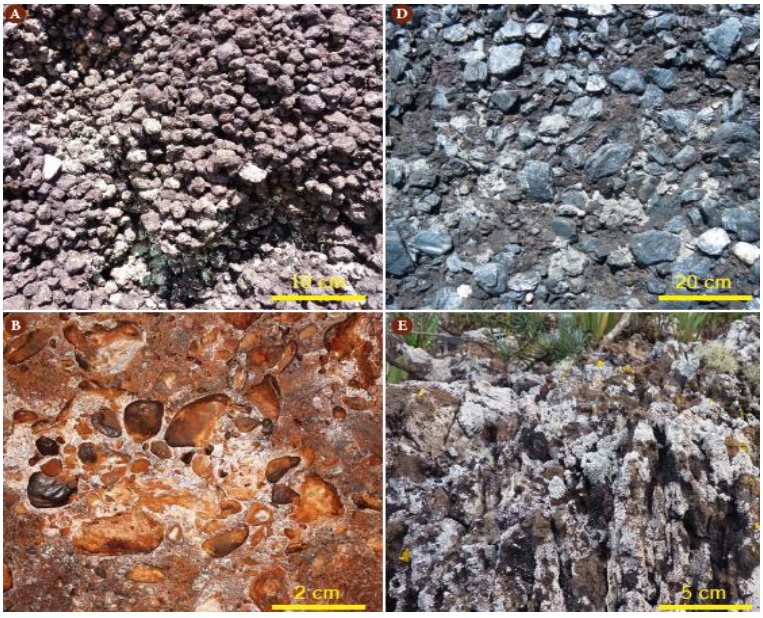
A canga (laterita, ferricrete, *ironstone*, dentre outros) compõe substrato com atributos

específicos no tocante à formação de solos e desenvolvimento de plantas. Trata-se de formações cuja origem se deu em razão da concentração de compostos ferruginosos unindo materiais variados, sendo o resultado da atuação intensa de fatores climáticos acerca do material geológico, que trazem indícios de movimentos climáticos passados. Chamado por alguns autores e especialistas em estudos geológicos como paleossolos, em razão de sua origem poligenética (COSTA, 2003).

Carvalho Filho (2008) elucidou que as referidas formações são frequentemente vistas capeando substratos geológicos ricos em ferro, isto é, formações ferruginosas, que no Brasil é comum nas regiões do Quadrilátero Ferrífero (MG), Carajás (PA) e Urucum (MS). O autor destaca que o Quadrilátero Ferrífero se refere a uma província geológica de reconhecimento mundial por sua riqueza mineral, bem como pela abastança de minério de ferro.

No Brasil, o minério de ferro supergênico tem em sua cobertura, uma crosta laterítica nomeada canga, termo originalmente empregado na descrição sobre ou perto da superfície do solo ferruginoso sobrejacente. Trata-se de uma rocha composta por quantidades que variam de material detrítico advindo de itabirito ou minério de hematita de elevado teor cimentado por Fe- e Al-oxyhydroxis. A Figura 2 mostra diferentes couraças de canga que protegem o minério de ferro friável:

Figura 2: Couraças de canga



Fonte: Instituto Pristino, 2020.

A pedra ferrífera está associada a planaltos montanhosos e, portanto, além das altas concentrações de metais (principalmente ferro e manganês), os ecossistemas de canga,

assim como outros afloramentos rochosos, são caracterizados pelo isolamento e pela aspereza ambiental. Vale observar que a canga está exposta de forma direta na superfície ou coberta por pouco solo e as profundidades dos perfis de canga oscilam de poucos centímetros chegando até 30 m e, em razão de ser fisicamente resistente e quimicamente estável, diversas vezes forma cristas e planaltos que definem a paisagem (PEREIRA, 2016).

Os solos lateríticos (canga) são inférteis devido ao intemperismo prolongado do leito rochoso. Nitrogênio (N), fósforo e potássio são severamente esgotados, enquanto alguns nutrientes são inacessíveis, pois se ligam a compostos lateríticos. Esta extensa lixiviação também torna os solos lateríticos ácidos, com lixiviados de serapilheira de eucalipto também estimulando a acidificação do solo e a mobilização de ferro (SOUZA et al*.,* 2014).

Baixo teor de matéria orgânica do solo e teores de argila em horizontes próximos à superfície resultam em uma baixa capacidade de troca catiônica ou mesmo conferem uma capacidade de troca aniônica que promove mais lixiviação. A zona pálida é geralmente altamente salina devido ao acúmulo de sais ao longo de milhares de anos, tornando-a inóspita para muitas espécies microbianas e vegetais (SILVA, 2011).

Como os solos de canga são derivados de material laterítico erodido e redistribuído, eles herdaram muitas dessas limitações. Isso pode ter implicações importantes para o manejo das culturas nessas áreas, uma vez que as comunidades microbianas são críticas na execução de funções vitais para a saúde do solo e crescimento das culturas, como ciclagem de nutrientes e supressão de doenças (PIERINI, 2006).

O campo rupestre refere-se a uma fitofisionomia altamente especializada que ocorre especialmente em montanhas do Sudeste, Centro e Nordeste do Brasil, que está na faixa de 21º10' e 10º S. Possui distribuição descontínua, dada por solos rasos e afloramentos rochosos e a vegetação de campo rupestre conta com diversas espécies endêmicas, que evoluíram e ajustaram-se à elevadas variações de temperatura e oferta hídrica, solos ácidos e oligotróficos e ocorrência de incêndios (CIPRIANE et al*.,* 2016).

Os campos rupestres sobre canga são encontrados em topo de montanhas como visto na Figura 3, sendo uma visão parcial da Serra da Piedade em Caeté, MG, definidos como vegetações herbáceas e arbustivas de solos rasos e arenosos. Encontra-se esse tipo de vegetação na Serra do Espinhaço em Minas Gerais e Bahia, e na Chapada dos Veadeiros, em Goiás (VASCONCELOS, 2011; ANDRINO; GONELLA, 2021).

Os campos rupestres são associados a regiões com altas altitudes, cerca de 900 m acima do nível do mar, desenvolvendo em afloramento rochoso de hematitas, quartzito,

arenito ou pedra-ferro, também conhecidos como cangas (MIOLA; RAMOS; SILVEIRA, 2021; GONÇALVES; DORES; FERNANDES, 2022). Percorrem principalmente entre os biomas da Mata Atlântica, Caatinga e Cerrado (VASCONCELOS, 2011).

Figura 3: Visão de parte da Serra da Piedade, Caeté-MG – Campo rupestre sobre canga

Fonte: Instituto Prisinos, 2022.

Os campos rupestres sobre solo canga ferruginosa, estão em sua maior parte localizados no Quadrilátero Ferrífero (QF), na parte central do Estado de Minas Gerais, tendo uma área de aproximadamente 7.200 km². Diferentemente dos outros, este campo tem o solo rico em ferro, de forma mais específica com estruturas chamadas de canga ferruginosa, que estão presentes em todo o QF (GONTIJO, 2008).

Em Minas Gerais, a canga ferruginosa localiza-se no centro-leste do estado, com uma área estimada em aproximadamente de 7.000 Km², com altitudes mais elevadas nos topos das Serras do Ouro Branco, de Itabira, do Curral e da Moeda, ocupando áreas principalmente dos municípios de Belo Horizonte, Congonhas, Mariana, Nova Lima, Ouro Preto e Santa Bárbara. Por obter características distintas de qualquer outra região, apresenta uma considerável taxa de biodiversidade, porém com alta quantidade de endemismo devido a pressão da ação do homem nesta região (JACOBI; CARMO; VICENT, 2008; JACOB et al*.,* 2015).

Uma das maiores ameaças da biodiversidade e das formações florestais no ecossistema da canga é a degradação ambiental, pois provoca a perda de hábitat naturais.

As principais causadoras de degradação são a ação antrópica, nas quais se encontram a criação de gado, a formação de trilhas clandestinas, a deposição incorreta de lixo, edificações, coleta predatória de espécies nativas e mineração (WILCOX; MURPHY, 1985; NOVACEK; CLELAND, 2001). A mineração ocorre principalmente com a exploração de minério de ferro, bauxita, manganês e outras pedras preciosas como esmeralda, como ouro e esmeralda. As atividades minerárias podem causar maior degradação do solo, por exemplo, quando se expõe o ouro a condições de oxidação (ROESER; ROESER, 2010).

3.3 Microrganismos e componentes químicos no solo canga

Devido às intensivas atividades de mineração, o ecossistema edáfico da canga vem sendo degradado. Várias espécies vegetais, como também, microrganismos, podem estar desaparecendo mesmo antes de serem estudados. Segundo Caneschi (2018), a prospecção de microrganismos nessas áreas se mostra um excelente ambiente alvo de estudo para possíveis novas descobertas, como também, para um melhor entendimento dos processos adaptativos destes microrganismos nestes ambientes inóspitos. Pereira (2016, p.19) detalhou:

> O isolamento de *Aspergillus* e *Penicillium* do solo é comum, já que as condições são favoráveis para o seu crescimento, principalmente pela abundância de compostos orgânicos neste ecossistema. E devido a essa ampla ocorrência de ambos os gêneros no solo, o isolamento e identificação de suas espécies pode contribuir para um melhor entendimento da estrutura da comunidade do solo e da função dessas espécies nesse ecossistema. A presença de metais pesados no solo pode alterar a composição microbiológica, levando a uma diminuição da biodiversidade, entretanto pode também acarretar a seleção de linhagens resistentes ao impacto proveniente da exploração de minérios, e estas podem apresentar potencial biotecnológico ainda inexplorado.

Lemes (2018) retratou a existência de uma alta diversidade de microrganismos em solos de canga do QF, fortalecendo o patrimônio biológico e biotecnológico da região. Dentre os microrganismos identificados os Filos Actinobacteria e Cloroflexi e gêneros Actinoallomurus e Cystobacter foram os mais frequentes.

Os solos das zonas úmidas, em contraste com os solos das terras altas, são geralmente anóxicos e, portanto, suportam a produção de gases-traço (H_2, CO, CH_4, N_2O e NO) por bactérias anaeróbicas, como fermentadores, metanogênicos, acetogênicos, redutores de sulfato e desnitrificadores.

Walden et al (2015) citam a repelência à água sendo uma característica comum dos solos ferruginosos (canga), causada principalmente por ceras hidrofóbicas das folhas de

eucalipto e outras plantas que aderem às partículas do solo, reduzindo assim a permeabilidade do solo e a infiltração de água. Os autores citam que a atividade microbiana pode aliviar gradualmente a repelência à água do solo degradando esses compostos hidrofóbicos. No entanto, os microrganismos também podem exacerbar a repelência à água, uma vez que decompõem o conteúdo hidrofílico mais rapidamente, levando ao acúmulo de compostos hidrofóbicos. Além disso, exsudados microbianos podem se tornar hidrofóbicos em condições quentes e secas.

As comunidades microbianas do solo exibem respostas amplas e significativas aos atributos geofísicos e à vegetação. O pH do solo é frequentemente relatado como o mais forte preditor de variações espaço-temporais nas comunidades microbianas do solo, com solos neutros tipicamente exibindo maior diversidade em relação aos solos ácidos. Possivelmente devido às suas associações com o pH do solo e a capacidade de retenção de nutrientes, foi demonstrado que a capacidade de troca catiônica (CEC) afeta significativamente o funcionamento e a composição da comunidade microbiana do solo (DOCHERTY et al*.,* 2015).

A condutividade elétrica do solo (CE), que está intimamente ligada à salinidade, capacidade de troca de cátions e matéria orgânica do solo, é relatada como correlacionada negativamente com a diversidade bacteriana. Outros fatores do solo relatados como covariando com a diversidade bacteriana incluem textura (distribuição de lodo, areia e argila) e conteúdo total de carbono, ambos relacionados à área de superfície específica do solo (SES) e capacidade de troca catiônica (CTC). A pesquisa sobre as respostas da comunidade microbiana à repelência à água do solo é limitada; embora um aumento do domínio de Actinobacteria*,* incluindo Actinomycetes degradadores de cera, tenha sido associado a solos repelentes de água (LOZANO et al., 2014).

A cobertura vegetal pode alterar significativamente as comunidades microbianas, mas essas respostas são inconsistentes e imprevisíveis devido à variação dos atributos físico-químicos do solo. De fato, as associações entre a vegetação e as comunidades microbianas do solo variam de muito fracas ou ausentes em alguns estudos para significativo em outro lugar (WALDEN et al., 2015).

Em termos gerais, compreende-se que os microrganismos no solo são essenciais para a manutenção das funções do solo em solos naturais e manejados devido ao seu envolvimento em processos-chave, incluindo formação da estrutura do solo, remoção de toxinas, decomposição de matéria orgânica e reciclagem de carbono, nitrogênio, fósforo e

enxofre. Além disso, os microrganismos desempenham papéis vitais na promoção do crescimento das plantas, na supressão de doenças das plantas transmitidas pelo solo e na criação de vegetação. Portanto, a diversidade microbiana nos habitats do solo, que pode ser usada como um indicador do ecossistema, tem gerado maior interesse.

3.4 Metagenômica

Como visto anteriormente, o solo é provavelmente o ecossistema de microrganismos mais complexo e heterogêneo da Terra. A diversidade das comunidades microbianas do solo excede a de outros ambientes. Katz, Hover e Brady (2016) explicaram que a metagenômica do solo é uma abordagem molecular para investigar a diversidade das comunidades microbianas do solo.

Em se tratando da metagenômica, esta pode ser dividida em duas abordagens de sequenciamento específica: *shotgun* e *amplicon*. A abordagem *shotgun* sequencia DNA total de todos os microrganismos presentes na amostra, fornecendo a estrutura taxonômica e funcional das comunidades microbianas. Já metodologia de *amplicon* ou metataxonômica, sequencia um gene marcador filogenético específico, sendo o 16s rRNA o mais utilizado para procariotos e o 18S ou ITS para eucariotos (LIU et al., 2021).

A metodologia deve respeitar o tipo de amostra, objetivo da pesquisa e orçamento. Desta forma é de suma importância conhecer as vantagens e limitações de cada abordagem, para que sejam aplicadas corretamente (Quadro 1).

Quadro 1: Vantagens e limitações dos métodos de sequenciamento de próxima geração (NGS) usados em análise de microbioma

Metodologia	Vantagens	Limitações
Amplicon (16S/18S/ITS)	• Análise rápida • Exigência de baixa biomassa • Aplicável a amostras contaminadas pelo DNA hospedeiro	• Viés de PCR e primer • Resolução limitada ao nível de gênero
Shotgun	• Resolução taxonômica para nível de espécie • Potencial Funcional	• Caro • Análise Demorada • Contaminação derivada dos hospedeiros

Fonte: Adaptado de LIU *et al.,* 2021

O sequenciamento *shotgun* é uma técnica de laboratório para determinar a sequência de DNA do genoma de um organismo. O método envolve quebrar aleatoriamente o genoma

em pequenos fragmentos de DNA que são sequenciados individualmente. O sequenciamento metagenômico *shotgun* permite que os pesquisadores obtenham amostras abrangentes de todos os genes em todos os organismos presentes em uma determinada amostra complexa. O método permite que os microbiologistas avaliem a diversidade bacteriana e detectem a abundância de microrganismo em vários ambientes (KATZ, HOVER, BRADY, 2016).

De acordo com Sharrar et al (2020), os benefícios do sequenciamento metagenômico *shotgun* incluem sua escalabilidade, sua capacidade de fornecer informações funcionais e taxonômicas de todo o DNA presente em uma amostra e a versatilidade dos dados coletados.

Ao contrário do sequenciamento capilar ou abordagens baseadas em PCR, o NGS permite que os pesquisadores sequenciem milhares de organismos em paralelo. Com a capacidade de combinar muitas amostras em uma única execução de sequenciamento e obter alta cobertura de sequência por amostra, o sequenciamento metagenômico baseado em NGS pode detectar membros de abundância muito baixa da comunidade microbiana que podem ser perdidos ou são muito caros para identificar usando outros métodos (CALLAHAN, MCMURDIE; HOLMES, 2017).

O sequenciamento de *rRNA 16S* é outro método usado para estudos de metataxonômica (KANG; LEE, 2016). Matsuo et al*.,* (2020) destacam que o sequenciamento de RNA ribossômico (rRNA) do espaçador transcrito interno 16S e do espaçador transcrito interno (ITS) são métodos comuns de sequenciamento de *amplicon* usados para identificar e comparar bactérias ou fungos presentes em uma determinada amostra. Segundo Sharrar *et al* (2020), sequenciamento do gene ITS e 16S rRNA baseado em sequenciamento de próxima geração (NGS) são métodos bem estabelecidos para comparar a filogenia e a taxonomia de amostras de microbiomas complexos ou ambientes que são difíceis ou impossíveis de estudar.

O gene procariótico 16S rRNA tem aproximadamente 1.500 pb de comprimento, com nove regiões variáveis intercaladas entre regiões conservadas. Regiões variáveis do gene 16S rRNA são frequentemente utilizadas para classificação filogenética de gêneros ou espécies em diversas populações de microrganismos (GEVERS et al*.,* 2012).

Matsuo et al (2020), assinalam que um dos principais benefícios dos métodos NGS de RNA ribossômico 16S e ITS é que eles fornecem uma técnica econômica para identificar cepas que podem não ser encontradas usando métodos tradicionais. Ao contrário do

sequenciamento capilar ou das abordagens baseadas em PCR, o sequenciamento de próxima geração é um método sem cultura que permite a análise de toda a comunidade microbiana dentro de uma amostra. O 16S rRNA permite que os microbiologistas obtenham sensibilidade em nível de gênero para pesquisas metataxonômica de populações bacterianas (CALLAHAN, MCMURDIE; HOLMES, 2017).

Sabe-se que diferentes aplicações genômicas têm diferentes pontos fortes. As bibliotecas *amplicon* são úteis para identificar rapidamente mutações vantajosas, analisar a diversidade genética em certas regiões genômicas. A tecnologia de sequenciamento metagenômica é particularmente útil para coletar informações sobre as espécies e genes funcionais de microrganismos, e capturar DNA microbiano de uma variedade de estados fisiológicos. Assim, a metagenômica é valiosa para investigar os microrganismos do solo que dominam vários processos cruciais, como crescimento de plantas e ciclagem de elementos como C e P (KANG; LEE, 2016).

Katz, Hover e Brady (2016) destacaram que o sequenciamento *amplicon* é uma maneira eficaz de investigar todos os microrganismos presentes em diversas amostras, incluindo: Identificar e direcionar os organismos de interesse. Anotando e classificando microrganismos abundantes em um ensaio, para obter uma composição completa de comunidades microbianas. O sequenciamento de *amplicon* permite que os pesquisadores sequenciem alvos variando de alguns a centenas de genes em uma única execução.

Assim, a metataxonômica *amplicon* é uma escolha interessante para projetos cujo objetivo é estudar e caracterizar a diversidade microbiana presente em amostras e entender como as comunidades microbianas variam em diferentes habitats. É particularmente útil para amostras ambientais com uma grande diversidade de microrganismos, como o solo (KANG; LEE, 2016).

As ferramentas de metataxonomia analisam dados de sequenciamento de alto rendimento, principalmente do sequenciamento do gene 16S rRNA e DNAseq, para identificar microrganismos e vírus dentro de uma mistura complexa. Com a crescente demanda por análise do microbioma funcional, os estudos de metatranscriptoma atraem mais interesse (GEVERS et al., 2012).

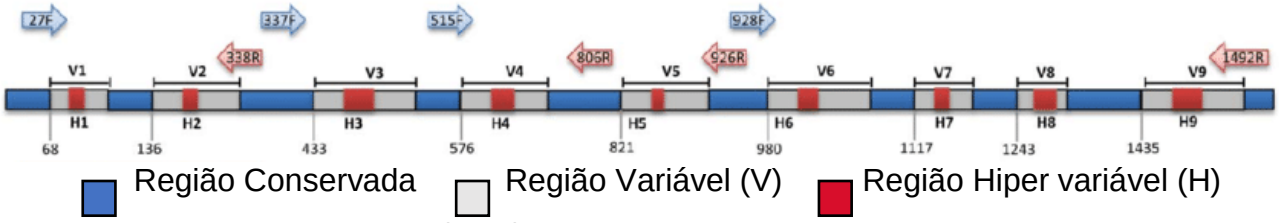
Ferramentas de metataxonomia analisam dados de sequenciamento para identificar microrganismos e vírus de misturas complexas. Essas ferramentas podem ser divididas em duas categorias principais com base nos dados que processam para identificar microrganismos: sequenciamento de marcadores curtos (por exemplo, genes 16S e 18S/ITS

rRNA para bactérias e fungos, respectivamente) e sequenciamento de DNA *shotgun* (DNSeq). No entanto, a identificação de microrganismos e a compreensão de seu papel na saúde e na patogênese do hospedeiro representam desafios para a comunidade de bioinformática (CALLAHAN, MCMURDIE; HOLMES, 2017).

Os maiores desafios para a metataxonomia são (1) processar um grande volume de dados de sequência de forma eficiente, (2) lidar com informações ambíguas, quando a mesma sequência corresponde a várias espécies e (3) classificar com resolução abaixo do clado do gênero. Por exemplo, na análise de DNAseq, as sequências podem se alinhar a vários táxons, possivelmente em diferentes clados (CARUSO et al*.,* 2019). Na análise metataxonômica 16S, uma sequência é mapeada para uma unidade taxonômica operacional (OTU), que representa um agrupamento de organismos em vez de um organismo específico (CALLAHAN, MCMURDIE; HOLMES, 2017).

Gene 16s rRNA está divido na região secundária em 9 regiões: V1-V9. Cada região tem uma parte super conservada, variável e hiper variável (Figura 4). Para identificação dos procariotos, o gene é amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) com *primers* que se ligam a regiões conservadas e, em seguida, são sequenciados. Os dados de sequenciamento são submetidos à análises através da bioinformática, em que as regiões variáveis são usadas para discriminar os táxons bacterianos (MATSUO et al*.,* 2021).

Figura 4: Regiões conservadas, variáveis e hipervariáveis dentro do gene 16S rRNA e os vários pares de primers usados para sequenciamento



Fonte: Adaptado SHAHI; FREEDMAN; MANGALAM, 2017

As regiões conservadas do gene 16S rRNA permitem identificar organismos, visto que são comuns a todas as bactérias. Essas regiões são frequentemente usadas como alvos para a amplificação por PCR para identificar bactérias em amostras ambientais ou clínicas (ALVES, 2020).

As regiões variáveis e hipervariáveis do gene 16S rRNA são importantes para a

identificação e diferenciação de espécies bacterianas. Essas regiões são frequentemente usadas para análise filogenética e construção de árvores evolutivas, permitindo a classificação das bactérias em grupos filogenéticos (VIEIRA, 2021).

Além disso, a análise de metataxonômica é frequentemente usada para estudar a diversidade bacteriana em diferentes ambientes, como solos, água e intestinos de animais. Isso é importante para entender a ecologia e a diversidade bacteriana em diferentes ecossistemas, bem como identificar potenciais patógenos, ajudando no desenvolvimento de tratamentos e terapias (ALVES, 2020).

Mais do mapeamento da composição taxonômica de uma amostra, a tarefa mais desafiadora para estudos metagenômicos é a avaliação da contribuição gênica de cada membro da comunidade investigada em termos de genes funcionais. Para resolver esse problema, o sequenciamento metagenômico *shotgun* é a estratégia mais adequada. Aqui, longas moléculas de DNA, como cromossomos completos, são quebradas aleatoriamente em fragmentos que são sequenciados. Assim, os dados metagenômicos fornecem conhecimento sobre a composição taxonômica do ecossistema em estudo, mas também sobre os genes funcionais na amostra, uma informação que não é recuperável com o sequenciamento do gene 16S rRNA. Por outro lado, a metagenômica *shotgun* requer maior abrangência do que a metataxonômica.

3.4.1 Unidades taxonômicas operacionais (OTU’s) e Variantes de Sequência amplicon (ASV’s)

As sequências são agrupadas em compartimentos chamados 'Unidades taxonômicas operacionais' (OTUs) com base na similaridade (CARUSO et al*.,* 2019). O conceito de OTU’s, que constrói táxons definidos "matematicamente", é amplamente aceito e aplicado para descrever comunidades bacterianas usando o sequenciamento *amplicon* do gene 16S rRNA. Os OTU’s são frequentemente usados para inferir características e funções uma vez que são considerados representantes justos dos membros da comunidade. No entanto, a ligação entre táxons moleculares, táxons reais e OTU’s parece ser muito mais complicada. Cepas da mesma espécie bacteriana (idealmente pertencentes à mesma OTU) geralmente compartilham apenas alguns genes (o genoma central), enquanto outros genes são específicos da cepa e únicos (CALLAHAN, MCMURDIE; HOLMES, 2017).

Como exposto por Callahan et al (2019), normalmente, a similaridade entre um par de sequências é calculada como a porcentagem de sítios que concordam em um

alinhamento de sequência par a par. Um limite de similaridade comum usado é 97%. Do cluster OTU, uma única sequência é selecionada como uma sequência representativa. A sequência representativa é anotada usando um método de classificação 16S e todas as sequências dentro da OTU herdam essa mesma anotação. Vários pipelines foram desenvolvidos para realizar toda a análise 16S de ponta a ponta, incluindo QIIME e MOTHUR citados por Callahan et al (2019).

Um dos maiores benefícios do agrupamento OTU, segundo defendem Caruso et al (2019), é computacional. Normalmente, uma análise de *amplicon* 16S pode ter milhões de leituras, no entanto, isso pode resultar em apenas milhares de OTU's. Análises *downstream,* como alinhamento de sequência múltipla (MSA) ou estimativa de filogenia, tornam-se mais tratáveis ao trabalhar no conjunto de sequência representativo. Assim, o agrupamento permite uma análise rápida dos conjuntos de dados *amplicon*.

No entanto, Kunin et al (2010) destacam que tem havido muitas críticas ao uso de similaridade percentual de sequência para definir OTU's. Primeiro, a similaridade percentual da sequência pode superestimar a similaridade evolutiva entre pares de sequências. Por exemplo, a similaridade de sequência calculada a partir de alinhamentos de pares subestima o número de substituições em comparação com a similaridade calculada a partir de MSA's. Além disso, os autores mencionam que a similaridade percentual é uma métrica de distância não evolucionária; não leva em consideração que múltiplas substituições podem ocorrer no mesmo local. Esses estudos sugerem que a melhor prática para calcular a similaridade entre sequências é usar distâncias corrigidas evolutivamente com base em um MSA; no entanto, as análises típicas usam distâncias não corrigidas com base em alinhamentos de sequência de pares.

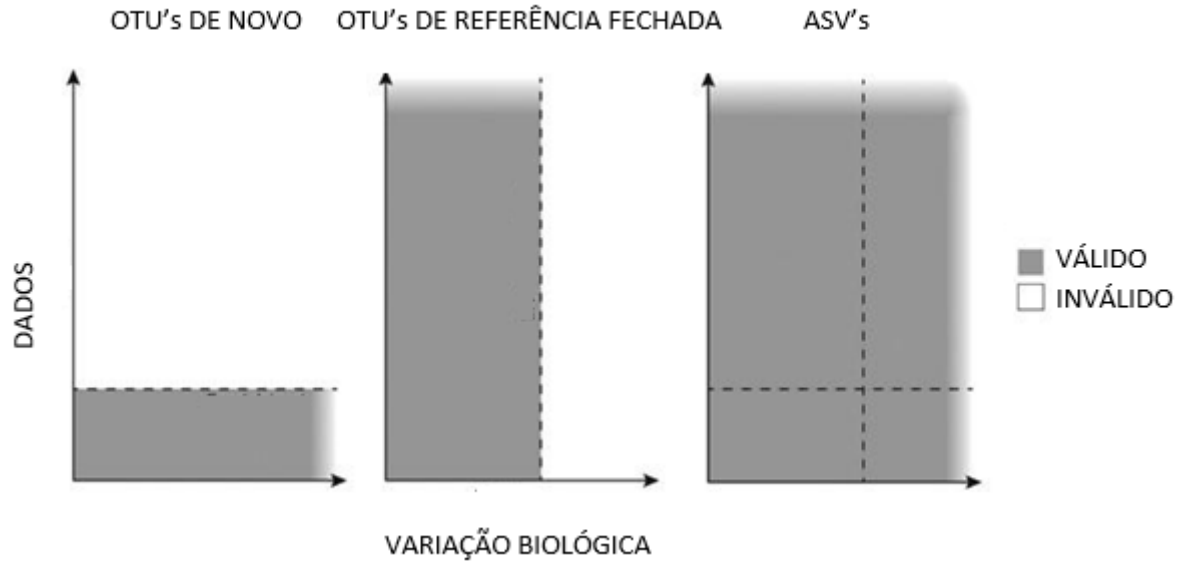
Em segundo lugar, o limite exemplo, duas espécies diferentes podem ter sequências 16S 99% semelhantes como *Bacillus globisporus* e *B. psychrophilus* ou a mesma cepa pode ter múltiplas cópias do gene 16S rRNA que diferem em 5% para algumas regiões. Mesmo usando as regiões hipervariáveis ainda pode levar à ambiguidade; Huse e outros. descobriram que 18% da região V3 mapeada para duas ou mais sequências de rRNA.

Em relação às variantes de sequenciamento de amplicons (ASVs), estas foram propostas como uma alternativa às unidades taxonômicas operacionais (OTUs) para analisar comunidades microbianas. A popularidade dos ASV's cresceu, em parte devido ao desejo de refletir um nível mais refinado de taxonomia, uma vez que eles não agrupam sequências com base em um limite baseado em distância (CARUSO et al., 2019).

De acordo com Callahan et al (2019), os ASV’s são inferidos por um processo de novo no qual as sequências biológicas são discriminadas dos erros com base, em parte, na expectativa de que as sequências biológicas tenham maior probabilidade de serem observadas repetidamente do que as sequências que contêm erros. Como resultado, a inferência ASV não pode ser executada independentemente em cada leitura - a menor unidade de dados da qual os ASV’s podem ser inferidos é uma amostra. No entanto, ao contrário dos OTU’s de novo, os ASV’s são rótulos consistentes porque os ASV’s representam uma realidade biológica que existe fora dos dados que estão sendo analisados: a sequência de DNA do organismo analisado. Assim, ASV’s inferidos independentemente de diferentes estudos ou diferentes amostras podem ser validamente comparados.

A representação esquematicamente a validade de OTU’s de novo, OTU’s de referência fechada e ASV’s atribuídos a partir de um conjunto de dados focal comum na Figura 5. O eixo x representa toda a variação biológica que existe no locus genético sequenciado. O eixo y representa todos os dados *amplicon* gerados a partir desse locus e todos os dados futuros que podem ser gerados. A região de validade para o tipo de recurso está sombreada:

Figura 5: Esquema de validade de OTU’s de novo, OTU’s de referência fechada e ASV’s



Fonte: Adaptado Callahan, McMurdie e Holmes, 2017.

A extensão da validade de OTU’s de novo, OTU’s de referência fechada e ASV’s determinada a partir de um conjunto de dados focais. Este esquema enfatiza as limitações inerentes a ambas as classes de OTU’s. As OTU’s de novo são inválidas fora do conjunto de dados em que foram definidas. As OTU’s de referência fechada não podem capturar a variação biológica fora do banco de dados de referência usados em sua construção. Os ASV’s transcendem essas limitações: os ASV’s capturam toda a variação biológica presente nos dados, e os ASV’s inferidos de um determinado conjunto de dados podem ser reproduzidos em conjuntos de dados futuros e validamente comparados entre os conjuntos de dados (EDGAR, 2017).

Fica então compreendido, que, ao analisar o sequenciamento do microbioma direcionado, é necessária uma abordagem diferente para determinar a origem da sequência do que os métodos típicos baseados em alinhamento. Isso ocorre porque o gene de origem de um gene alvo amplificado já é conhecido e o objetivo é determinar sua origem taxonômica com base em um número potencialmente pequeno de variações em relação a táxons semelhantes. No contexto do sequenciamento do genoma inteiro, é improvável que um pequeno número de ASV’s causadas por erro do sequenciador confunda seriamente um alinhador e tenha pouco efeito na atribuição final da sequência.

O sequenciamento direcionado, em que a comparação de várias sequências semelhantes, em vez do alinhamento entre vários genomas, é a principal operação, tem o potencial de ser confundido por ASV’s errôneos. Isso pode resultar na atribuição incorreta da sequência, levando à detecção de um organismo semelhante, mas incorreto, ou à falsa descoberta de um novo organismo. Felizmente, duas estratégias foram desenvolvidas para minimizar os efeitos do erro de sequenciamento direcionado, cada uma com suas próprias vantagens, desvantagens e idiossincrasias.

Existem muitos argumentos de que o campo deveria estar caminhando para uma abordagem ASV. Conforme declarado acima, as abordagens ASV podem fornecer uma vantagem significativa para uma identificação mais precisa de microrganismos. Além disso, eles podem fornecer uma imagem mais detalhada da diversidade dentro de uma amostra. Uma OTU, sendo um agrupamento de várias sequências semelhantes que podem ser sequências “reais” da amostra ou erros, pode conter várias espécies semelhantes de microrganismos agrupados em uma única unidade. Um ASV não tem esse problema, pois mesmo uma única diferença de base na sequência resultará em um ASV exclusivo e em uma imagem mais detalhada da diversidade de uma determinada amostra (EGAR, 2017).

Kunin et al (2010) alertam para a existência de um compromisso potencialmente significativo entre os métodos de geração de OTU, onde um seleciona a facilidade computacional de geração e comparação de OTU's, enquanto o outro seleciona a falta de viés de referência, com um terceiro método que combina os dois para um resultado intermediário. As OTU's de referência fechada são computacionalmente rápidas e fáceis para geração e comparação entre amostras e estudos, mas carregam um risco significativo de viés de referência e perda de novas sequências. As OTU's de novo são computacionalmente lentas, mas retêm todas as sequências da amostra e não apresentam risco de viés de referência, pois são geradas sem referência.

De acordo com Edgar (2017), as OTU's de referência aberta estão em algum lugar entre esses métodos, dependendo da natureza da amostra e o autor cita as abordagens de OTU baseadas em referência ainda são uma escolha válida em grandes estudos populacionais, como o *Human Microbiome Project* 6, que contribuiu com uma grande visão para o campo por meio do registro de um grande número de indivíduos e da análise e caracterização completa de amostras onde os táxons esperados já estão bem definidos e bem documentados nos bancos de dados de referência. Não se espera que as preocupações com o viés de referência para esses tipos de amostra sejam especialmente altas, e a eficiência computacional e a facilidade de adicionar novos dados e comparar amostras ajudam a manter os requisitos de recursos computacionais sob controle.

Em comparação, uma análise de microrganismos que vivem em uma caverna subaquática remota e inexplorada na Amazônia, onde as condições da água são altamente incomuns em termos de conteúdo mineral, pH e temperatura, quase certamente exigiria uma pesquisa de nova geração de OTU mais significativa. Esse tipo de cenário certamente faria bem em adotar rapidamente uma abordagem ASV para facilitar a comparação de dados e a adição de novos dados, além de permitir a aceitação apenas de sequência exata e de alta confiança para bancos de dados de referência (EDGAR, 2017).

3.5 Análise de Componentes Principais

A análise de componentes principais (*Principal Component Analysis* – PCA), é um método de redução de dimensionalidade frequentemente usado para reduzir a dimensionalidade de grandes conjuntos de dados, transformando um grande conjunto de variáveis em um menor que ainda contém a maior parte das informações do grande conjunto (SIMON; DANIEL, 2011).

De acordo com Wang et al (2021), a redução do número de variáveis de um conjunto de dados ocorre naturalmente às custas da precisão, mas o truque na redução da dimensionalidade é trocar um pouco de precisão pela simplicidade. Porque conjuntos de dados menores são mais fáceis de explorar e visualizar e tornam a análise de pontos de dados muito mais fácil e rápida para algoritmos de aprendizado de máquina sem variáveis estranhas para processar. Ou seja, a ideia do PCA é simples – reduzir o número de variáveis de um conjunto de dados, preservando o máximo de informação possível.

Os componentes principais são a chave do PCA; eles representam o que está por trás dos seus dados. Em termos leigos, quando os dados são projetados em uma dimensão inferior (suponha três dimensões) a partir de um espaço superior, as três dimensões nada mais são do que os três componentes principais que capturam (ou mantêm) a maior parte da variação (informação) dos seus dados (IVANNOVA et al., 2016).

Edgar (2017) descreve que os componentes principais têm direção e magnitude. A direção representa em quais eixos principais os dados estão mais espalhados ou têm maior variação e a magnitude significa a quantidade de variação que o Componente Principal captura dos dados quando projetado nesse eixo. Os componentes principais são uma linha reta e o primeiro componente principal contém a maior variação nos dados. Cada componente principal subsequente é ortogonal ao último e tem uma variância menor. Dessa forma, dado um conjunto de x variáveis correlacionadas em y amostras, se obtém um conjunto deu componentes principais não correlacionados nas mesmas y amostras.

A razão pela qual se obtém componentes principais não correlacionados dos recursos originais é que os recursos correlacionados contribuem para o mesmo componente principal, reduzindo assim os recursos de dados originais em componentes principais não correlacionados; cada um representando um conjunto diferente de recursos correlacionados com diferentes quantidades de variação (TURNBAUGH; GORDON, 2008).

Como dito anteriormente, os solos são parte importante para a qualidade do ambiente, e a compreensão de diferentes aspectos relacionados à taxonomia e detalhes sobre o solo ajudará a avançar no conhecimento e uso dos solos para um melhor ambiente. A PCA é uma técnica estatística multivariada usada para analisar relações entre um grande número de variáveis e um número menor de objetos. PCA constitui a base da análise multivariada de dados baseada em métodos de projeção. O uso mais importante do PCA é representar uma tabela de dados multivariados como um conjunto menor de variáveis (índices de

resumo) para observar tendências, saltos, *clusters e outliers*. Esta visão geral pode revelar as relações entre observações e variáveis, e entre as variáveis (IVANNOVA et al., 2016).

O PCA é uma ferramenta muito flexível e permite a análise de conjuntos de dados que podem conter, por exemplo, multicolinearidade, valores faltantes, dados categóricos e medições imprecisas. O objetivo é extrair informações importantes dos dados e expressar essas informações como um conjunto de índices resumidos chamados componentes principais (VIEIRA, 2021).

Wang et al (2021) explicam que, estatisticamente, o PCA encontra linhas, planos e hiperplanos no espaço K-dimensional que aproximam os dados da melhor forma possível no sentido dos mínimos quadrados. Uma linha ou plano que é a aproximação de mínimos quadrados de um conjunto de pontos de dados torna a variação das coordenadas na linha ou plano tão grande quanto possível.

Neste estudo, os objetos são as amostras de solo e as variáveis são os componentes de caracterização do solo e as inter-relações e são explicadas por meio de variáveis denominadas componentes principais.

Os dados das variáveis de solo obtidos a partir das caracterizações são transformados, auto dimensionados e avaliados utilizando a PCA para distinguir geoquimicamente os solos. A relação estatística entre a taxonomia do solo e as características físicas e químicas do solo é obtida a partir da análise exploratória reconstruída. Usando a PCA, consegue-se agrupar as ordens e subordens de solos escolhidas a partir da base de dados para articular a estrutura latente que poderia conectar as propriedades físicas e químicas do solo à taxonomia do solo e critérios morfológicos (ALVES, 2020).

As técnicas utilizadas para estimar a qualidade do solo incluem análise de componentes principais (PCA), uma PCA normalizada e parâmetros comuns do solo (textura do solo, pH, CO, N, P e K). Edgar (2017) explica que a PCA pode ser utilizada para distinguir as amostras por suas propriedades e realizar uma decomposição ortogonal de múltiplas variáveis do solo em um conjunto reduzido decomponentes principais que, por sua vez, contêm uma combinação linear de variáveis de solo covariáveis. Correlações gráficas entre as cargas variáveis e os gráficos de escores indicam as semelhanças e diferenças entre cada ordem taxonômica de solos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

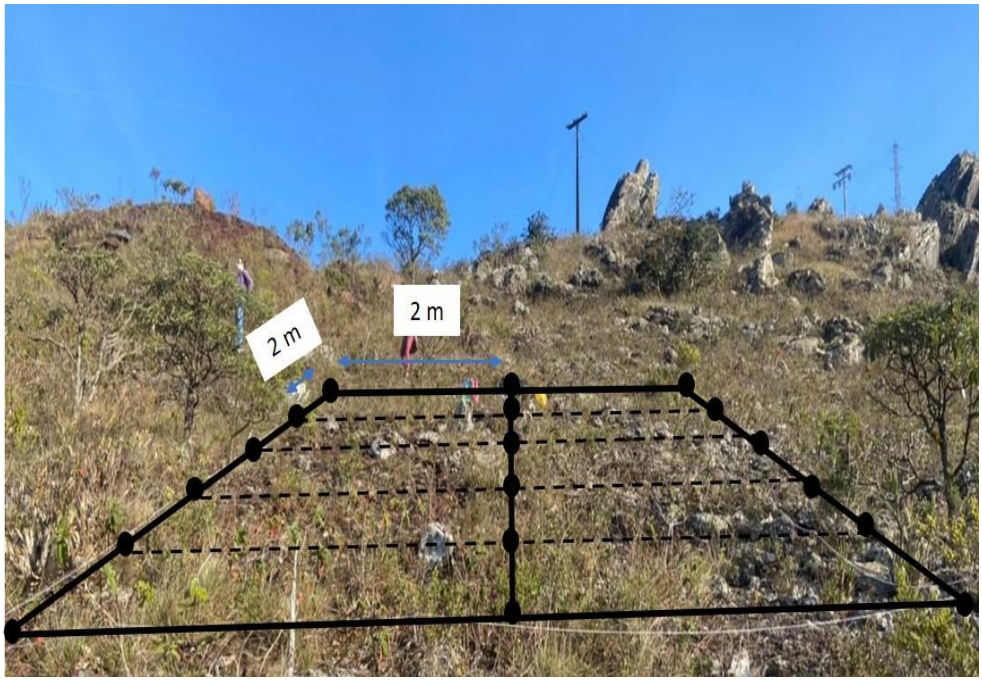
4.1 Área de estudo e coleta das amostras

Os índices de diversidade utilizados para avaliar os metagenomas de comunidades procarióticas do solo em diferentes níveis filogenéticos foram comparados. Foram considerados os seguintes índices: o número de táxons detectados e os índices de Shannon, Simpson. A análise da diversidade das comunidades procarióticas foi baseado na análise de genes 16S rRNA. O PCA dos índices de diversidade em relação às propriedades do solo de canga foram determinados a partir dos locais de amostragem.

As amostras que são representativas e que não apresentaram triplicatas foram coletadas no Monumento Natural Estadual da Serra da Piedade (MONAESP), na região do Santuário da Serra da Piedade, situado a 50 Km da capital Belo Horizonte, na divisa dos municípios Sabará e Caeté/MG inserido na borda lateral Rupestre sobre a canga ferruginosa (19º49’21,51” S 43º40’38,22” O) totalizando 108 m^2. O clima da região é classificado como subtropical de altitude e a temperatura média durante o ano é de 21ºC, sendo que as maiores temperaturas são registradas no trimestre de janeiro a março e as menores temperaturas no trimestre de junho a agosto (LOPES, 2008).

As amostras foram retiradas na profundidade de até 10 cm, em dezoito pontos amostrais, em três transectos diferentes (L1, L2, L3), onde seis pontos foram amostrados em cada transecto, com distanciamento de 2 metros entre eles, no dia 19/06/2021 (Figura 6).

Figura 6: Área de coletas das amostras



Fonte: Próprio Acervo

As amostras foram destorroadas e passadas em peneira de malha de 2 mm e secas ao ar para as análises químicas. As amostras, para a extração do DNA, foram acondicionadas em tubos Falcon de 50 mL e mantidas sob refrigeração (-20ºC).

4.2 Caracterização físico-química do solo

A caracterização química das amostras de solo coletadas foi realizada pelo Laboratório Análise de Solos do Instituto Mineiro de Agropecuária (LASO - IMA, 2022). Foram quantificados: pH método potenciométrico; Ca^{2+}, Mg^{2+} método de absorção atômica; Al^{3+} método volumétrico por titulação com hidróxido de sódio; P método colorimétrico com emprego de ácido ascórbico; K método direto por fotômetro de chama; capacidade de troca catiônica (CTC) e soma de bases (SB) através de cálculos; matéria orgânica método colorimétrico. Os microelementos (Cu, Fe, Mn, Zn) foram quantificados utilizando solução através absorção atômica (PROFERT – MG, 2023).

4.3 Extração e Sequenciamento de DNA

Segundo Wang *et al* (2021), *Metabarcoding* do gene 16S rRNA é comumente usados para caracterizar comunidades microbianas, estimando a abundância relativa de micorganismos. Aqui, adotou-se um método para recuperar as concentrações do gene 16S rRNA por grama de qualquer amostra ambiental usando um padrão sintético em quantidades minúsculas (100 ppm a 1% das sequências 16S rRNA) adicionado à amostra antes da extração do DNA e quantificado por reações quantitativas de reação em cadeia da polimerase (qPCR). Isso permite a normalização pela densidade microbiana inicial, levando em conta o rendimento de recuperação de DNA.

O DNA metagenômico das amostras foi extraído de 250 mg de solo utilizando o kit *DNeasy® PowerSoil® Pro Kit* (Qiagen, Alemanha) seguindo as instruções do fabricante. A concentração do material genético foi medida em equipamento NanoDrop (Thermo Scientific).

As amostras de DNA foram enviadas para sequenciamento na empresa Zymo Research Corporation (Botucatu - SP, Brasil). O conjunto de iniciadores universais 341F (CCTACGGGRSGCAGCAG) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) foram usados para amplificar o gene 16S rRNA da região amplificada V3-V4, de acordo com protocolo próprio da empresa. Os *amplicons* foram sequenciados utilizando a plataforma *Illumina MiSeq*.

4.4 Bioinformática

As *reads* obtidas passaram pelos processos de remoção dos adaptadores, filtragem por qualidade, montagem dos pares de sequências e eliminação de sequências repetidas para análises de taxonomia. Em seguida, os *contigs* foram montados e avaliados quanto a região de interesse serão identificadas as regiões 16s rRNA para a identificação procariotos quanto à taxonomia, abundância e diversidade da comunidade presente em cada uma das amostras biológicas.

Foi utilizado FastQC (ANDREWS, 2010) para avaliação de qualidade, após foi realizado o *merge* de todas as leituras diretas e reversas através de VSEARCH (ROGNES *et al.,* 2016), remoção de primers utilizando o Cutadapt (MARTIN, 2011) e geração de tabelas ASV’s com USEARCH (EDGAR, 2010), as classificações taxonômicas dos ASV’s foram realizadas com o algoritmo SINTAX (EDGAR, 2016) do USEARCH e o banco de dados

taxonômico SILVA, e finalmente, a consolidação da tabela de abundâncias das AVS's com as classificações taxonômicas é realizada com o *script* local *get_abundances_table_asv.py*. O pipeline foi desenvolvido por meio da linguagem de programação Python 3 e o código fonte encontra-se disponível no GitHub: https://github.com/LBMCF/pipeline-for-amplicon-analysis.

4.5 Estatística

Para realizar análises de diversidade foram utilizados os índices de Simpson (SIMPSON, 1949) e Shannon (SHANNON, 1948) calculados a partir da linguagem R do RStudio®, versão 4.2.3. com a biblioteca "vegan".

Foi realizada uma análise de componentes principais (PCA), utilizando os resultados das análises químicas de solo. A análise objetivou-se agrupar os pontos amostrados dos atributos químicos semelhantes. PCA foi feita utilizando a linguagem R do software RStudio®, versão 4.2.3 através das bibliotecas "rJava", "xlsx", "FactoMineR", "factoextra", "ggplot2" e os dados foram padronizados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Sequenciamento dos *amplicons* da região

O sequenciamento dos *amplicons* da região V3-V4 do gene 16S rRNA gerou um total de 3.754.490 sequências, com número médio de 208.582 mil sequências por amostra. Após o filtro de qualidade, o número total de sequências obtidas foi 1.065.670, representando 28,38% do total de sequências (Tabela 1).

As variantes de sequência de *amplicon* (ASV's) gerou um total de 865.667 reads, foram inferidas a partir das leituras filtradas com acurácia de 99,92% (Tabela 1).

Tabela 1: Estatísticas do sequenciamento metataxonômico considerando todas as amostras coletadas na área do Monumento Natural Estadual Serra da Piedade

Amostras	Reads Brutas	Reads Merged	Reads Filtradas	Reads (ASV)
AM1	177.446	80.769	47.983	39.533
AM2	181.662	82.380	50.994	42.979
AM3	226.814	103.150	64.715	54.861
AM4	210.516	95.804	59.973	47.625
AM5	255.840	116.278	72.937	56.895
AM6	174.566	79.444	48.925	32.634
AM7	197.138	89.834	56.854	48.320
AM8	162.526	73.862	46.716	39.010
AM9	217.788	99.264	62.788	53.182
AM10	239.408	108.277	66.100	55.425
AM11	243.328	110.893	69.314	53.127
AM12	260.902	118.643	74.780	61.829
AM13	173.884	79.505	50.416	41.824
AM14	150.698	68.646	42.593	34.236
AM15	275.094	124.957	78.339	62.083
AM16	215.556	98.209	60.458	49.794

Tabela 1: continuação

Amostras	Reads Brutas	Reads Merged	Reads Filtradas	Reads (ASV)
AM17	193.142	88.056	55.719	45.522
AM18	198.182	89.723	56.066	46.788
Total	**3.754.490**	**1.707.694**	**1.065.670**	**865.667**

Fonte: elaborado pela autora, 2023.

5.2 Análise taxonômica

A Tabela 2 e 3 descrevem os resultados encontrados com base na classificação de filo e gênero encontrados nas amostras analisadas.

Tabela 2: Abundância Relativa (%) da abordagem *amplicon* 16S rRNA das amostras de solo de canga em nível de filo

Filo	AM 1	AM 2	AM 3	AM 4	AM 5	AM 6	AM 7	AM 8	AM 9	AM1 0	AM1 1	AM1 2	AM1 3	AM1 4	AM1 5	AM1 6	AM1 7	AM1 8
Acidobacteriota	14,0	11,5	11,6	14,5	11,4	11,1	12,7	15,0	14,3	12,9	13,8	11,2	6,45	13,7	14,5	10,7	14,0	11,3
Actinobacteriota	36,5	40,0	32,9	40,1	45,7	43,1	35,6	41,1	33,4	39,5	45,6	33,9	62,3	35,1	35,1	41,6	40,5	44,6
Bacteroidota	0,3	0,9	0,8	0,7	0,6	0,9	0,5	0,3	0,3	0,2	0,6	1,0	0,2	0,9	0,2	0,2	0,4	0,4
Chloroflexi	12,1	11,7	17,0	7,9	9,0	5,8	14,8	10,8	16,5	10,9	6,1	15,0	5,3	13,9	13,0	15,3	13,3	12,6
Cyanobacteria	0,67	4,75	1,37	0,39	0,31	0,55	1,13	0,20	0,41	0,35	0,81	0,67	0,21	0,39	0,45	0,85	0,16	0,63
Myxococcota	1,2	1,1	1,56	2,0	1,4	2,7	1,3	0,7	0,9	1,4	1,3	2,0	0,4	0,9	1,0	0,6	0,7	0,97
Planctomycetota	6,5	4,0	7,0	4,8	4,1	3,5	6,3	5,1	7,1	6,4	3,5	6,3	1,9	5,3	5,8	4,9	4,7	5,0
Proteobacteria	22,7	21,0	19,3	24,9	23,0	28,6	21,0	20,3	18,4	20,6	25,4	22,6	20,5	23,2	25,1	20,4	17,6	17,6
Verrucomicrobiota	2,2	1,8	3,0	2,1	1,4	1,2	3,2	2,3	2,9	3,2	1,1	2,2	1,4	2,6	2,2	2,3	2,8	2,2
WPS-2	2,3	1,6	2,9	1,3	1,6	1,1	2,0	3,0	3,9	2,4	0,9	1,7	1,4	2,6	1,4	2,1	4,4	2,5
Outros	1,4	1,5	2,4	1,1	1,3	1,5	1,4	1,1	1,8	1,9	1,0	3,2	1,2	1,3	1,3	1,1	1,4	2,2

Tabela 3: Abundância Relativa (%) da abordagem *amplicon* 16S rRNA das amostras de solo de canga em nível de gênero

Gênero	AM 1	AM 2	AM 3	AM 4	AM 5	AM 6	AM 7	AM 8	AM 9	AM 10	AM 11	AM 12	AM 13	AM 14	AM 15	AM 16	AM 17	AM 18
1921-2	3,2	0,9	0,7	1,6	1,7	0,8	1,0	1,8	2,0	1,7	0,6	0,3	0,3	2,2	2,7	2,9	2,0	1,7
1921-3	2,4	0,7	2,0	1,4	2,2	0,8	1,8	2,4	3,9	2,2	0,8	1,5	0,1	2,9	1,4	1,8	2,5	2,3

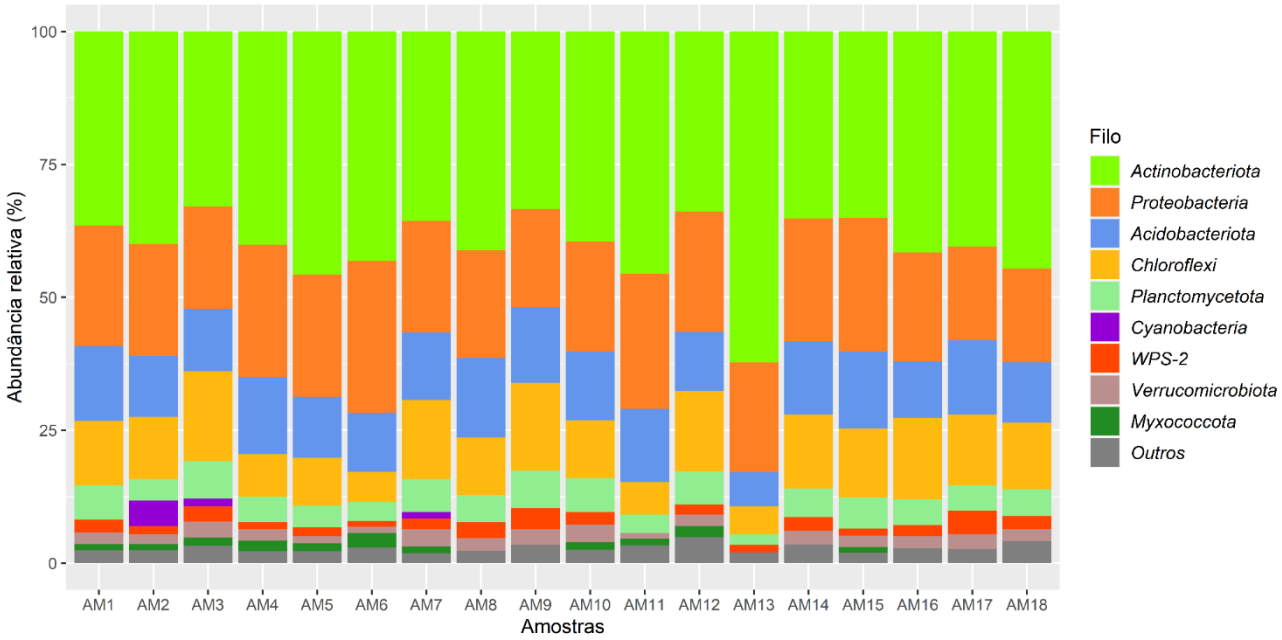
Tabela 3: continuação

Gênero	AM 1	AM 2	AM 3	AM 4	AM 5	AM 6	AM 7	AM 8	AM 9	AM 10	AM 11	AM 12	AM 13	AM 14	AM 15	AM 16	AM 17	AM 18
Acidibacter	1,6	0,9	1,2	2,7	1,6	2,1	1,4	1,4	1,2	1,8	1,8	1,0	0,7	1,2	2,0	1,2	1,0	1,5
Acidiphilium	2,2	4,8	5,3	1,2	1,7	1,7	2,6	2,6	3,5	1,9	1,9	5,5	0,9	2,6	1,5	2,0	2,4	1,6
Acidothermus	20,1	11,4	7,77	16,5	18,7	9,5	13,3	17,5	11,5	19,8	17,1	5,24	21,5	16,5	25,5	16,4	15,1	13,5
Actinomycetospora	0,7	1,5	0,99	0,9	1,2	1,3	0,5	0,9	0,7	0,4	1,3	1,6	0,7	0,6	0,3	0,6	0,7	0,7
Bradyrhizobium	5,4	4,1	3,20	8,3	6,1	8,2	5,9	3,6	2,6	5,5	8,4	3,2	4,9	3,8	6,3	4,2	3,4	4,7
Bryobacter	12,5	13,4	14,2	9,5	7,8	7,0	13,7	16,2	18,7	11,1	10,2	12,0	4,4	14,9	13,1	11,5	17,0	9,3
Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia	1,2	0,4	0,24	1,2	1,1	0,9	0,8	0,6	0,3	1,0	2,1	0,4	0,9	1,0	0,9	0,6	0,5	1,0
Candidatus Solibacter	3,6	2,8	3,70	4,6	2,9	3,2	3,3	3,7	3,8	3,8	3,4	3,5	1,5	3,7	5,2	3,4	3,5	2,8
Candidatus Udaeobacter	1,8	2,0	5,04	2,2	1,0	1,0	3,7	1,3	3,5	3,0	0,9	3,2	0,0	2,4	1,3	0,2	2,5	2,8
Conexibacter	14,2	16,9	16,96	15,0	15,5	12,8	15,3	20,2	20,9	16,3	9,6	16,2	29,7	14,2	13,7	21,0	24,3	18,2
Crossiella	2,7	1,6	4,05	2,3	3,0	0,8	6,3	4,9	5,2	4,5	4,8	5,3	1,1	2,3	0,4	6,3	2,8	10,5
FCPS473	1,4	0,4	0,45	0,2	0,4	0,1	0,3	0,5	0,5	0,6	0,1	0,3	1,2	0,8	0,8	1,8	0,7	0,9
Haliangium	0,0	1,0	1,61	1,8	1,2	3,0	1,2	0,6	0,9	1,3	1,0	1,4	0,0	0,7	0,6	0,4	0,7	0,7
HSB OF53-F07	2,1	0,5	0,43	0,7	1,4	0,3	0,5	1,5	1,5	0,7	0,2	0,2	0,5	2,3	3,3	2,7	1,0	0,8
Jatrophihabitans	0,9	3,9	2,61	2,0	2,5	3,0	1,7	0,8	0,8	1,3	3,3	3,4	1,8	1,5	0,2	0,4	0,7	1,8
Mycobacterium	8,2	8,6	4,05	8,0	10,4	10,9	7,6	9,5	5,5	9,2	8,5	3,1	19,6	7,4	8,9	12,9	8,9	7,1
Pseudonocardia	0,7	5,2	5,38	1,7	2,4	3,4	3,0	0,9	1,8	1,0	2,5	5,7	0,2	2,2	0,4	0,4	1,2	3,7
RB41	0,5	0,7	1,82	0,2	0,2	0,3	1,3	0,1	0,9	0,3	0,9	1,1	0,00	0,3	0,2	0,0	0,5	1,6
Roseiarcus	1,6	1,2	1,19	1,6	1,3	0,9	1,3	1,2	1,8	1,5	1,0	0,8	0,9	1,1	2,2	1,2	0,8	0,9
Outros	12,8	17,0	17,00	16,3	15,6	27,9	13,2	8,0	8,5	11,0	19,7	24,9	8,7	15,3	9,3	8,1	7,5	12,4

A abordagem do amplicon 16S rRNA detectou 28 Filos, 50 Classes, 49 Famílias e 185 gêneros bacterianos. O domínio Bactéria foi observado com abundância relativa de 96,31% e Archaea 3,69%, demonstrando grande predomínio de Bactéria sobre *Archaea* nas comunidades do solo canga.

A composição taxonômica em nível de filo da comunidade bacteriana do solo de canga e suas respectivas abundâncias são apresentadas na Figura 7. As bactérias pertencentes ao filo Actinobacteriota (40,7%), Proteobacteria (21,79%), Acidobacteriota (12,5%), Chloroflexi (11,73%), Planctomycetota (5,14%), WPS-2 (2,19%), Verrucomicrobiota (2,17%), Myxococcota (1,24%) representaram os grupos com maior abundância relativa (≥ 1% da comunidade total).

Figura 7: Distribuição dos filos mais abundantes encontrados nas amostras do solo de canga



Fonte: dados da pesquisa, 2023.

Actinobactérias é um dos mais diversos grupos de bactérias na natureza. Seus membros variam de organismos unicelulares anaeróbios a linhagens aeróbicas, filamentosas e formadoras de esporos. São abundantes em ambientes de solo, especialmente aqueles com pH mais alto, e em ecossistemas marinhos e de água doce (ADAMS et al., 2011).

Além de sua importante influência na saúde humana, as Actinobacterias têm papéis ecológicos importantes. Antes de se concentrar na descoberta de antibióticos, o trabalho do ganhador do Prêmio Nobel Selman Waksman sobre bactérias do solo e seu impacto na produtividade agrícola foi um dos primeiros a implicar as Actinobacterias como importantes contribuintes para o processo de decomposição da biomassa vegetal. Mais recentemente, as Actinobacterias foram reveladas como simbiontes generalizados de eucariotos, ajudando os herbívoros a obter acesso à biomassa vegetal como mutualistas nutricionais e produzindo produtos naturais como mutualistas defensivos (ADAMS et al*.,* 2011).

Já as Proteobacteria são um filo de bactérias Gram-negativas, muito comuns em ambientes de solo incluindo as rizosferas, solos salinos e solos semiáridos e estão relacionadas a uma ampla gama de funções envolvidas na ciclagem de carbono, nitrogênio

e enxofre (BODEN et al*.,* 2017). Embora as espécies de Proteobacterias possam ser encontradas em uma variedade de ambientes, a maioria dessas espécies é mesófila, o que significa que elas preferem temperaturas moderadas (20-45ºC) para crescer e prosperar (GARRITY; HOLT, 2001). Porém algumas demonstraram ser termofílicos (como tepidomonas e thermosulfata) e outras que são capazes de sobreviver em temperaturas extremamente baixas (por exemplo, Polatomonas) (BODEN et al*.,* 2017).

O filo Chloroflexi abrange um grupo de bactérias ecológica e fisiologicamente diverso, que foram detectados em uma gama cada vez mais ampla de habitats anaeróbios e termifílico (BARKA et al*.,* 2016; HANADA, 2014).

Assim como foi visto nos resultados desse estudo, Costa et al (2021) constataram uma quantidade substancial de diversidade de Acidobacteriota, assim como o terceiro mais encontrado nos resultados dessa pesquisa, um filo consistentemente encontrado entre táxons abundantes em solos em todo o mundo.

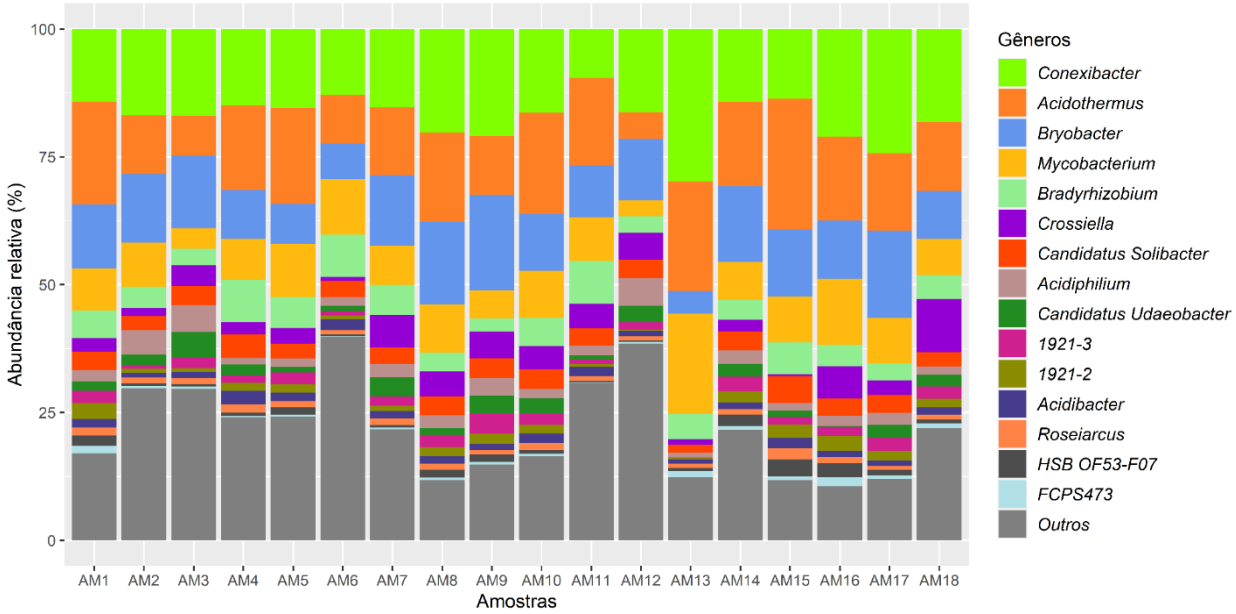
Costa et al (2021) também apontaram que em solos lateríticos ferruginosos, as populações de Actinobacteriota se destacam pela eficácia na remoção de ferro e, como resultado, na solubilização de fosfato, sendo o filo mais proeminente nas amostras analisadas neste estudo.

Em semelhança com o tipo de solo analisado nesta pesquisa, tomando amostras de solo laterítico e de campo rupestre como objeto de pesquisa, Guo et al. (2023) constataram a abundância dos filos de bactérias do solo variaram de acordo com as mudanças de nutrientes. Sob diferentes camadas do solo, as três bactérias dominantes nos solos mistos ferruginosos convergem com este estudo: os filos Actinobacteriota, filo Proteobacteria e filo Chloroflexi, o que também foi verificado nos resultados das amostras analisadas neste estudo.

O filo Actinobacteria apresentou maior correlação com nutrientes e os resultados mostraram que a rocha mole poderia melhorar a qualidade do solo arenoso, e que o crescimento microbiano foi dependente das características físico-químicas do solo Guo et al (2023).

A composição taxonômica em nível de gênero da comunidade bacteriana do solo de canga e suas respectivas abundâncias são apresentadas na Figura 8.

Figura 8: Distribuição dos gêneros mais abundantes encontrados nas amostras do solo de canga



Fonte: dados da pesquisa, 2023.

Os gêneros *Conexibacter* (17,28%), *Acidothermus* (15,39%), *Bryobacter* (12,04%), *Mycobacterium* (8,81%), *Bradyrhizobium* (5,1%), *Crossiella* (3,82%), *Candidatus Solibacter* (3,48%), *Acidiphilium* (2,55%), *Pseudonocardia* (2,32%), *Candidatus Udaeobacter* (2,09%), 1921-3 (1,84%), *Jatrophihabitans (*1,82%), 1921-2 (1,55%), *Acidibacter* (1,47%), *Roseiarcus* (1,20%), HSB OF53-F07 (1,15%), *Haliangium* (1,01%) representaram os grupos com maior abundância relativa (≥ 1% da comunidade total).

O gênero *Conexibacter* representa o gênero tipo da Família *Conexibacteraceae* com *Conexibacter woesei* como a espécie tipo do gênero. *C. woesei* é um representante de uma profunda linha evolutiva de descendência dentro do filo *Actinobacteria*. São bastonetes pequenos e curtos que são móveis por flagelos peritríquios. Eles podem formar agregados após um período de crescimento mais longo e, então, como uma característica típica, uma estrutura ondulada é formada pela autoagregação de flagelos com células bacterianas emaranhadas (MONCIARDINI et al*.,* 2003).

O gênero *Acidothermus* contém uma única espécie, *Acidothermus cellulolyticus*, isolada de uma fonte termal, constituída por bastonetes e filamentos sem endosporos, sem flagelos e com coloração de Gram variável. *A. cellulolyticus* foi isolado pela primeira vez de fontes termais ácidas no Parque Nacional de Yellowstone em 1987 (CHUNG et al., 2015).

Segundo Barabote et al (2009), o nome *Acidothermus* possui vários genes para a degradação da biomassa vegetal e têm valor para aplicações biotecnológicas.

Já o gênero *Bryobacter* acomoda bactérias de crescimento lento, estritamente aeróbias e tolerantes ambiente ácido, que habitam solos e pântanos (BELOVA et al*.,* 2018).

Ivanova *et al* (2016), explicam que as células dessas acidobactérias são Gram-negativas, não formadoras de esporos, imóveis, bastonetes curtos ou cocóides que se reproduzem por fissão binária. *Bryobacter* utiliza vários açúcares, polissacarídeos e ácidos orgânicos, desempenha um papel importante na ciclagem do carbono do solo (BELOVA et al*.,* 2018).

Mycobacterium pertence a um grupo bacteriano diversificado, onipresente em muitos solos e ambientes aquáticos. São bactérias Gram-positivas, catalase positivas, não móveis e não formadoras de esporos em forma de bastonete. A maioria das *Mycobacterium* são organismos aeróbicos, embora algumas espécies sejam microaerófilas (CHILIMA et al., 2006).

Shuster et al (2018), ao estudarem as formações de ferro em campos rupestres verificaram que a comunidade microbiana dos rejeitos era composta por *Proteobactérias* e *Cianobactérias* e, no nível de gênero, os rejeitos continham principalmente *Planktothrix sp*. e *Acidithiobacillus sp.* Em comparação, a comunidade microbiana dos capins Tifton-85 era mais diversa e era composta por *Actinobacteria, Acidobacteria, Proteobacteria e Firmicutes*. Embora *Actinobacteria* tenha constituído a maior porção da comunidade microbiana das TIFs, as unidades taxonômicas operacionais (OTU's) para *Mariprofundus* foram as mais abundantes. *Pseudonocardia* e *Conexibacter* foram os próximos gêneros mais abundantes com base nas abundâncias de OTU.

5.3 Índice de Diversidade

As Tabelas 4 e 5 destacam os índices de diversidade alfa calculados para cada amostra. A análise desses índices nos permite explorar os padrões de diversidade e avaliar o grau de heterogeneidade biológica na área de estudo.

Tabela 4: Alfa diversidade das amostras da área experimental do Monumento Natural Estadual Serra da Piedade em nível de filo

Identificação Amostra	Índice Diversidade Shannon	Índice Diversidade Simpson
AM1	1,7787	0,7754
AM 2	1,7929	0,7641
AM 3	1,9326	0,8047
AM 4	1,6885	0,7462
AM 5	1,6126	0,7145
AM 6	1,6078	0,7142
AM 7	1,8254	0,7852
AM 8	1,6968	0,7513
AM 9	1,8630	0,7992
AM 10	1,7857	0,7666
AM 11	1,5492	0,7034
AM 12	1,9005	0,7936
AM 13	1,2130	0,5621
AM 14	1,7877	0,7801
AM 15	1,7354	0,7719
AM 16	1,6848	0,7471
AM 17	1,7537	0,7628
AM 18	1,7260	0,7375

Fonte: elaborado pela autora, 2023.

Os resultados indicam que os índices de diversidade de Shannon e Simpson em nível de filo, foram maiores na amostra 3 (AM3) em comparação com as outras amostras (Tabela 4). Essa observação sugere que a diversidade presente na AM3 abriga uma variedade mais rica e uma distribuição mais equitativa das abundâncias relativas. A maior diversidade pode ser influenciada por fatores específicos do ambiente, como características do solo, disponibilidade de nutrientes ou outros fatores microambientais.

A Tabela 5 traz os resultados de Alfa diversidade em nível de gênero cada amostra da área experimental do Monumento Natural Estadual Serra da Piedade.

Tabela 5: Alfa diversidade das amostras da área experimental do Monumento Natural Estadual Serra da Piedade em nível de gênero

Identificação Amostra	Índice Diversidade Shannon	Índice Diversidade Simpson
AM1	3,0259	0,9077
AM 2	3,1780	0,9215
AM 3	3,2734	0,9280
AM 4	3,2064	0,9212
AM 5	3,1811	0,9147
AM 6	3,5460	0,9436
AM 7	3,1233	0,9206
AM 8	2,7423	0,8856
AM 9	2,8933	0,8945
AM 10	2,9471	0,9029
AM 11	3,2929	0,9288
AM 12	3,4623	0,9389
AM 13	2,3213	0,8208
AM 14	3,1310	0,9164
AM 15	2,7239	0,8804
AM 16	2,7269	0,8889
AM 17	2,7021	0,8747
AM 18	3,0955	0,9164

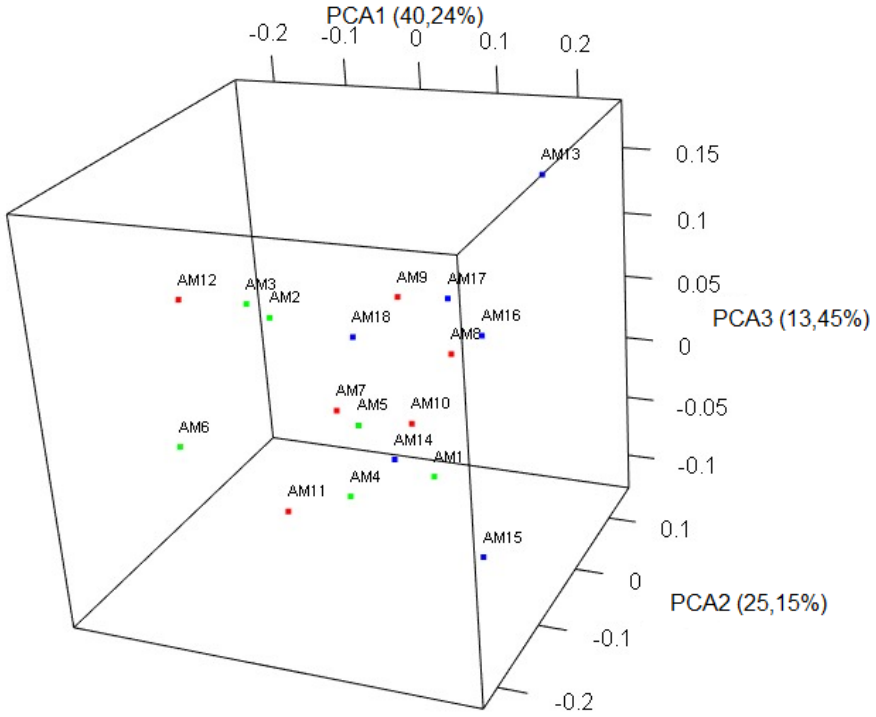
Fonte: elaborado pela autora, 2023.

Já os índices de diversidade de Shannon e Simpson em nível de gênero, indicaram que amostra 6 (AM6) tem maior diversidade (Tabela 5). Essa observação sugere que a AM6 abriga uma ampla gama de gêneros e que esses gêneros têm uma distribuição mais uniforme em termos de abundâncias relativas.

5.4 Análise de Componentes Principais dos Microrganismos

Através do Análise de Componentes Principais (3D-PCA) em relação aos dados microbiológicos, analisou-se um conjunto de dados que descreve as abundâncias relativas de diferentes gêneros de microrganismos nas 18 amostras no solo de canga (Figura 9).

Figura 9: Análise de componentes principais em nível de gênero dos microrganismos em amostras do solo de canga



A Análise de Componentes Principais tridimensional (3D-PCA) aplicada a todo o conjunto de dados, composto por 18 amostras e 184 variáveis, revelou que 78,84% da variabilidade dos dados pôde ser explicada pelas três primeiras componentes principais. No entanto, a análise não resultou na separação das amostras em grupos distintos, conforme ilustrado na Figura 9, indicando a ausência de diferenças entre as amostras.

5.5 Caracterização físico-química do solo

A Tabela 6 apresenta as amostras identificadas, o grupo a que pertence cada uma delas (L1, L2, L3) e os valores obtidos para: pH; matéria orgânica, carbono (C), nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}). De modo geral, verificou-se que as áreas apresentaram baixos valores de pH. Estes variam de 4,2 a 5,5, similares aos estudos de Messias *et al*. (2013) e Rocha *et al*. (2021), em solos Quadrilátero Ferrífero. Quanto ao teor de Ca^{2+} (0,60 a 3,07 cmol.carga/dm^3) e Mg^{2+} (0,07 a 0,37 cmol.carga/dm^3) apresentam valores baixos indicando um solo com baixa fertilidade como indicado em

estudos Camargo *et al* (2021) e Rocha *et al* (2021).

Tabela 6: Valores da matéria orgânica e fertilidade do solo de cada amostra da área experimental do Monumento Natural Estadual Serra da Piedade (MONAESP), Caeté, Minas Gerais

		pH	dag/Kg			mg/dm^3		cmol.carga/dm^3	
Identificação Amostra	**Grupo**	**H_2O**	**MAT. ORG.**	**C**	**N**	**P**	**K**	**Ca^{2+}**	**Mg^{2+}**
AM 1	L1	4,20	2,48	1,44	0,12	2,30	17,00	0,78	0,12
AM 2	L1	4,60	5,31	3,08	0,24	5,30	40,00	0,88	0,16
AM 3	L1	5,10	1,58	0,92	0,09	2,30	12,00	0,63	0,08
AM 4	L1	4,10	2,36	1,37	0,12	2,90	15,00	0,71	0,12
AM 5	L1	5,00	2,72	1,58	0,14	4,60	37,00	0,76	0,16
AM 6	L1	5,50	1,58	0,92	0,09	3,70	13,00	0,78	0,12
AM 7	L2	4,60	2,96	1,72	0,15	4,10	26,00	0,76	0,16
AM 8	L2	5,00	2,25	1,30	0,11	3,10	23,00	1,26	0,15
AM 9	L2	5,00	1,27	0,73	0,07	2,30	8,00	0,53	0,07
AM 10	L2	5,20	2,14	1,24	0,11	3,10	26,00	1,51	0,15
AM 11	L2	5,50	3,47	2,01	0,17	3,70	33,00	1,61	0,18
AM 12	L2	5,00	7,38	4,28	0,33	4,60	47,00	3,07	0,37
AM 13	L3	5,40	10,00	5,80	0,45	4,80	60,00	1,44	0,19
AM 14	L3	4,80	5,16	2,99	0,23	5,30	39,00	0,91	0,15
AM 15	L3	4,50	6,83	3,96	0,28	3,70	46,00	0,96	0,20
AM 16	L3	4,50	6,30	3,65	0,21	3,70	36,00	0,88	0,15
AM 17	L3	4,70	4,28	2,48	0,13	4,10	30,00	0,81	0,13
AM 18	L3	4,60	2,60	1,51	0,13	2,50	18,00	0,60	0,07

Fonte: elaborado pela autora, 2023.

Em relação a matéria orgânica percebe-se um baixo teor, assim como, de carbono e nitrogênio, o que reforça o estudo anteriormente citado de Mourão e Stehmann (2007). Segundo Schaefer et al (2015), uma possível explicação para tal dados foi a presença de muitas concreções e pisolitos, soltas ou cimentadas, influenciando na dinâmica hídrica e sequestro de carbono, já que os solos têm uma fraca proteção e retenção física da matéria orgânica adicionada, quando muito cascalhentos.

Neste sentido, segundo Rezende (2010), tendo em base dados paleoclimáticos, o processo de geração das cangas não se deu continuamente, havendo períodos de maior desenvolvimento, favorecidos por climas quentes e chuvosos e períodos de menor

desenvolvimento das cangas, associados a climas mais secos e frios, o que evidencia a diferença entre os resultados para as duas regiões.

A Tabela 7 apresenta os resultados dos micronutrientes disponíveis (Cu, Fe, Zn, Mn) nas amostras analisadas do Monumento Natural Estadual Serra da Piedade (MONAESP), Caeté, Minas Gerais medidos em 1 M HCl extrator usando a técnica ICP-OES.

Tabela 7: Valores dos microelementos do solo de cada amostra da área experimental do Monumento Natural Estadual Serra da Piedade (MONAESP), Caeté, Minas Gerais.

	Teor (mg/dm^3)			
Identificação Amostra	**Cu**	**Mn**	**Fe**	**Zn**
AM 1	3,10	7,10	141,70	2,00
AM 2	2,30	3,80	219,20	2,20
AM 3	0,30	3,00	117,90	1,70
AM 4	2,50	3,50	138,10	1,90
AM 5	4,40	12,60	133,20	3,10
AM 6	0,30	4,10	110,00	2,00
AM 7	0,30	4,50	141,20	1,70
AM 8	1,80	13,90	135,80	2,60
AM 9	0,20	1,90	118,50	0,80
AM 10	0,60	7,60	126,70	4,80
AM 11	0,30	9,00	159,70	3,40
AM 12	1,30	22,50	217,10	7,70
AM 13	0,40	7,50	769,90	3,10
AM 14	1,60	6,40	233,20	2,40
AM 15	1,70	5,00	623,10	2,50
AM 16	0,30	12,10	278,60	2,30
AM 17	0,30	3,70	223,90	1,80
AM 18	2,40	4,30	115,90	1,40

Fonte: elaborado pela autora, 2023.

Mesmo que sejam ricos em ferro os solos de canga mostram teores baixos de

micronutrientes (Zn, Cu, Mn) constituindo assim um ambiente onde há um extremo oligotrofismo associado a extremas variações hídricas e térmicas (SCHAEFER et al., 2015). No caso dos resultados do presente estudo, apresentam baixos teores de Zn, Cu, Mn exceto na amostra AM5, AM8, AM12, AM16. Esses dados contribuem com os identificados no presente estudo, onde, foi encontrado uma grande quantidade de ferro, mas os micronutrientes foram encontrados em quantidades baixas nas amostras (Tabela 7).

A análise química do solo é ainda mais importante em áreas de canga ferrífera, uma vez que esse tipo de solo apresenta particularidades que podem afetar a disponibilidade de nutrientes segundo Pereira (2012); Costa (2020) e Costa et al (2021). Camargo et al (2021) assinalam que a canga ferrífera é um tipo de solo característico das áreas de mineração, formado por camadas de rochas duras e oxidadas, que possuem alto teor de ferro e outros minerais como manganês e alumínio.

Os resultados da Tabela 8 apresenta os valores obtidos para a fertilidade do solo, considerando a soma de bases trocáveis (SB) de um solo, argila ou húmus representa a soma dos teores de cátions permutáveis, exceto H^+ e Al^{3+} ($SB = Ca^{2+} + Mg^{2+} + K^+$).

Tabela 8: Valores fertilidade do solo de cada amostra da área experimental do Monumento Natural Estadual Serra da Piedade (MONAESP), Caeté, Minas Gerais.

	cmol.carga/dm^3			%	
Identificação Amostra	**SB**	**CTC**	**CTC-ef**	**m**	**V**
AM 1	0,95	4,61	1,15	17,55	20,61
AM 2	1,14	7,66	1,71	33,12	14,91
AM 3	0,74	3,14	0,85	13,00	23,68
AM 4	0,86	4,24	1,07	19,78	20,27
AM 5	1,01	4,71	1,18	14,55	21,43
AM 6	0,93	3,03	1,01	7,99	30,73
AM 7	0,98	5,16	1,21	19,16	19,00
AM 8	1,47	4,67	1,58	7,03	31,45
AM 9	0,62	2,70	0,69	8,85	23,13
AM 10	1,73	4,26	1,83	5,52	40,54
AM 11	1,88	6,45	2,06	8,82	29,16
AM 12	3,57	7,39	3,68	3,02	48,28

Tabela 8: continuação

	cmol. carga /dm^3	%			
Identificação Amostra	**SB**	**CTC**	**CTC-ef**	**m**	**V**
AM 13	1,78	16,45	2,83	37,10	10,83
AM 14	1,16	7,12	1,62	28,66	16,24
AM 15	1,27	10,57	2,12	39,96	12,05
AM 16	1,12	7,79	1,71	34,27	14,43
AM 17	1,02	7,18	1,57	35,35	14,15
AM 18	0,73	4,15	0,91	20,04	17,50

Legenda: Soma de bases (SB); capacidade de troca catiônica (CTC); capacidade de troca catiônica efetiva (CTC-ef); Saturação em Alumínio (m%); Saturação por Bases (V%).

A capacidade de troca catiônica (CTC) variou de 3,70 a 16,45 cmol.carga/dm^3 nas amostras evidenciando o extremo grau de intemperismo dos solos (Tabela 8). No entanto, é importante notar que os valores mais elevados da Capacidade de Troca Catiônica (CTC) também foram observados nas amostras 13 (AM13) e amostra 15 (AM15) em que foi identificado o acúmulo de matéria orgânica de acordo com porcentagem de matéria orgânica no solo (m%). Isso sugere que, em solos metalíferos, a maior parte dessas cargas catiônicas provém da matéria orgânica (VASCONCELOS et al*.,* 2016).

A pobreza química dos solos também tende a contribuir para o acúmulo de carbono orgânico, uma vez que a disponibilidade nutricional da microbiota é limitada, fazendo com que as taxas de decomposição diminuam (SCHAEFER et al*.,* 2016).

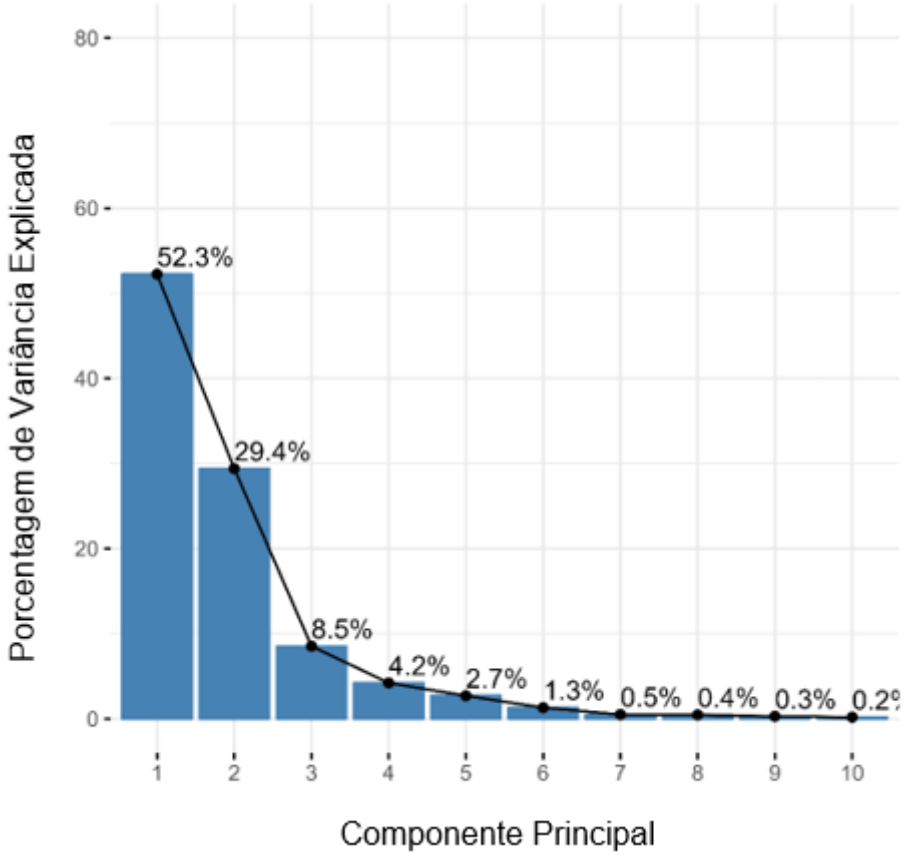
Entretanto se faz necessário estudos mais aprofundados a despeito das condições climáticas influírem diretamente nas condições do solo. Também se tem a necessidade de aprofundar mais os estudos relacionados ao objeto aqui estudado, tendo em vista, que a literatura sobre a temática ainda é muito limitada, principalmente no que tange ao solo do campo rupestre ferruginoso da Serra da Piedade, em Caeté-MG.

5.5.1 Análise de Componentes Principais dos parâmetros físico-químicos

A análise exploratória das variáveis relacionadas as propriedades do solo foram

realizadas via análise de componentes principais. Foram selecionados pH em H_2O, Matéria Orgânica, teores de Carbono, Nitrogênio, Fósforo, Potássio, Cálcio, Magnésio, Cobre, Manganês, Ferro e Zinco, Soma de Bases, Capacidade de Troca Catiônica, Capacidade de Troca Catiônica Efetiva, Índice de Saturação por Alumínio, Índice de Saturação por Bases, sendo a porcentagem da variação explicada na figura 10 e representação dos escores das amostras evidenciadas na Figura 11.

Figura 10: Distribuição da porcentagem de variabilidade explicada por componente principal

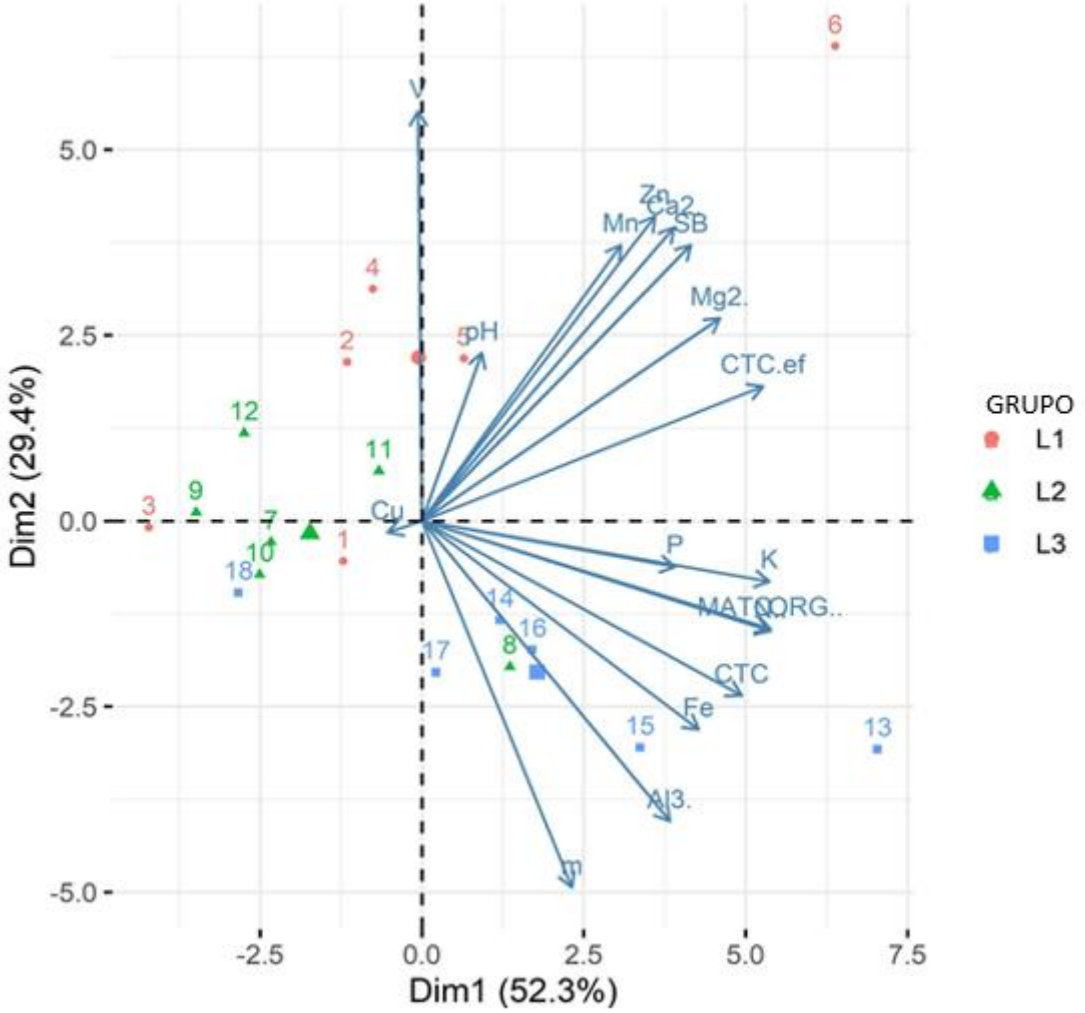


O PCA foi conduzido utilizando uma matriz de dados composta por 18 variáveis e 18 amostras de solos de canga. Previamente, os dados foram normalizados através do autoescalamento. Essa abordagem foi adotada devido à ampla variação nas respostas das diferentes variáveis, as quais diferem em ordens de grandeza.

A porcentagem de variância explicada no PCA é uma métrica importante para avaliar a eficácia da redução de dimensionalidade e entender quão bem os componentes principais representam a variabilidade presente nos dados. A componente principal 1 (Dim1) explicou

52,3% da variabilidade dos atributos do solo, enquanto a componente principal 2 (Dim2) explicou 29,4% da variabilidade dos dados, totalizando 86,7%.

Figura 11: Representação dos escores das amostras e cargas fatoriais via PCA



As variáveis do grupo L1 (AM1, AM2, AM4) destacaram-se por exibir uma relação mais expressiva com o Cu, com exceção de AM5 e AM6, que revelaram uma associação mais acentuada com Mn, Zn, Ca^{2+}, SB, Mg^{2+}, pH e CTC-ef (Figura 11). Por outro lado, o grupo L2 (AM7, AM9, AM10, AM11, AM12) apresentou níveis mais elevados de Cu, exceto AM8, que demonstrou uma predominância maior em relação a P, K, MO, N, CTC, Fe, e Al^{3+} (Figura 11). Já o grupo L3 (AM13, AM14, AM15, AM16, AM17, AM18) exibiu maiores quantidades de P, K, MO, N, CTC, Fe e Al^{3+} (Figura 11).

A PCA das variáveis mostrou que levando em conta todos os atributos químicos

analisados, as propriedades são semelhantes entre os grupos (Figura 11).

5.6 Efeito da Composição Química do Solo na Diversidade Microbiana do solo de Cangas

Como evidenciado previamente, as amostras 6 (AM6) e 13 (AM13) destacaram-se tanto em análises biológicas quanto químicas. A AM6, apesar de não exibir elevados escores que caracterizassem uma distinção marcante no gráfico PCA, revelou uma baixa soma de base (SB), refletindo também em teores reduzidos de Ca^{2+}, Mg^{2+} e K. Em termos de composição taxonômica, observou-se uma distribuição mais equitativa em comparação com as demais amostras, com ênfase nos gêneros *Conexibacter* (12,85%), *Mycobacterium* (10,88%) e *Acidothermus* (9,54%).

No caso da AM13, detectou-se uma maior presença de matéria orgânica, potássio, ferro, saturação por Al^{3+} (m%) e uma baixa saturação por bases (V%). Nas análises biológicas, registrou-se uma predominância dos gêneros *Conexibacter* (29,74%), *Acidothermus* (21,48%) e *Mycobacterium* (19,63%). Gêneros como *Conexibacter* desempenham função crucial na reciclagem de nitrogênio e carbono, participando ativamente na decomposição da matéria orgânica e no ciclo de nutrientes (CUNHA, 2023).

Conforme destacado por Siyao et al (2017), o gênero *Acidothermus* é comumente encontrado em solos ricos em matéria orgânica, dada a sua capacidade de degradação desse componente. Assim, a maior abundância desses gêneros nas amostras AM6 e AM13 pode ser atribuída às condições mais favoráveis oferecidas pelo solo dessas amostras.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que os filos que mais destacaram foram Actinobacteriota (40,7%), Proteobacteria (21,79%), Acidobacteriota (12,5%), Chloroflexi (11,73%). Já os gêneros de maior abundância são *Conexibacter* (17,28%), *Acidothermus* (15,39%), *Bryobacter* (12,04%).

Os valores de pH em água indicaram acidez elevada, associada em parte aos altos níveis de Al^{3+}, o que os torna aluminotóxicos para a maioria das plantas agrícolas. Níveis elevados de íons Fe e de Mn também contribuem para a sua toxidez. Baixa capacidade de troca catiônica, baixa soma de bases e alta saturação por Al^{3+}, caracterizam estes solos profundamente distróficos e, por isto, impróprios para a agricultura.

Os teores de carbono orgânico do solo (COT) variaram de 0,73 a 5,80 dag/kg, o que pode ser relacionado com a textura areno-argilosos, com capacidade de retenção de água relativamente baixa.

Já soma de bases (Cálcio, Magnésio) foram muito baixos em todas amostras, refletindo nos baixos valores de CTC. A pobreza de bases em geral é em decorrência do material de origem pobre nesses elementos e ao intemperismo intenso dos solos QF, apontando acentuada distrofia dos solos e valores de saturação por bases reduzidos (V).

Os resultados apontam que as características do solo de canga afetam a distribuição taxonômica e funcional; essas características incluem baixo teor de nutrientes, alta drenagem (ambos são solos arenosos), vegetação e exposição ao estresse.

A análise de componentes principais (PCA) dos parâmetros fisíco-químicos foi realizada através de uma matriz de dados composta por 18 variáveis e 18 amostras. A PCA das variáveis mostrou que levando em conta todos os atributos químicos analisados, as propriedades são semelhantes entre os grupos.

A análise tridimensional de Componentes Principais (3D-PCA), aplicada aos dados microbiológicos, envolveu a avaliação de um conjunto de dados que descreve as abundâncias relativas de gêneros de microrganismos em 18 amostras e 184 variáveis. Contudo, os resultados da análise não revelaram uma separação discernível entre as amostras, indicando a ausência de diferenças entre as amostras.

REFERÊNCIAS

ADAMS AS, JORDAN MS, ADAMS SM, SUEN G, GOODWIN LA, *et al*. Cellulose-degrading bacteria associated with the invasive woodwasp **Sirex noctilio**. ISME J. 2011;5(8):1323–31.

AKARI, M., UCHIDA, Y. Survival Rates of Microbial Communities from Livestock Waste to Soils: A Comparison between Compost and Digestate. **Appl. Environ. Soil Sci.,** 1–15. doi:10.1155/2021/6645203

ALARCÓN GUTIÉRREZ, E., HERNÁNDEZ, C., GARDNER, T., GARCÍA PÉREZ, J.A., CABALLERO, M., PERRONI, Y., FARNET DA SILVA, A.M.A., GAIME PERRAUD, I., BAROIS, I., 2021. Soil bioindicators associated to different management regimes of Cedrela odorata plantations. Madera y Bosques 27(1), e2711912.

ALVES, Higor de Oliveira. Caracterização integral do gene 16S rRNA de bactérias não esporulantes e sua ação contra Anticarsia gemmatalis Hübner 1818 (Lepidoptera, Noctuidae). 2020.

ANDERSEN M. H., MCILROY S. J., NIERYCHLO M., NIELSEN P. H., ALBERTSEN M. (2019). Genomic insights into *Candidatus* Amarolinea aalborgensis gen.nov., sp. nov., associated with settleability problems in wastewater treatment plants. ***Syst. Appl. Microbiol****.* 42 77–84. 10.1016/j.syapm.2018.08.001

ANDRINO, Caroline Oliveira; GONELLA, Paulo Minatel. An escape from the Espinhaço Range: a new species of Paepalanthus subg. Xeractis (Eriocaulaceae) from the campos rupestres of Serra do Padre Ângelo, Minas Gerais, Brazil. **Plant Ecology and Evolution**, v. 154, n. 1, p. 137-149, 2021.

Barabote RD, Xie G, Leu DH, Normand P, Necsulea A, Daubin V *et al*. (2009) Complete genome of the cellulolytic thermophile *Acidothermus cellulolyticus* 11B provides insights into its ecophysiological and evolutionary adaptations. *Genome Res* **19**: 1033–1043.

BARKA EA, VATSA P, SANCHEZ L, GAVEAU-VAILLANT N, JACQUARD C, *et al*. Taxonomy, physiology, and natural products of *Actinobacteria*. **Microbiol Mol Biol Rev. 2016;80(1):1–43.**

Belova SE, Ravin NV, Pankratov TA, Rakitin AL, Ivanova AA, Beletsky AV *et al*. (2018) Hydrolytic capabilities as a key to environmental success: chitinolytic and cellulolytic *Acidobacteria* from acidic sub-arctic soils and boreal peatlands. *Front Microbiol* **9**: 2775. doi: 10.3389/fmicb.2018.02775

Berger, S. A., Krompass, D. & Stamatakis, A. Performance, accuracy, and Web server for evolutionary placement of short sequence reads under maximum likelihood. Syst. Biol. 60, 291–302 (2011).

BHOWMIK, A., KUKAL, S.S., SAHA, D., SHARMA, H., KALIA, A., SHARMA, S., 2019. Potential indicators of soil health degradation in different land use-based ecosystems in the shiwaliks of northwestern India. Sustainability 11(14), 3908.

BISWAS, Rimi; SARKAR, Angana. 'Omics' tools in soil microbiology: the state of the art. **Advances in Soil Microbiology: Recent Trends and Future Prospects: Volume 1: Soil-Microbe Interaction**, p. 35-64, 2018.

BODEN R, HUTT LP, RAE AW. Reclassification of Thiobacillus aquaesulis as Annwoodia aquaesulis gen. nov., comb. nov., transfer of Thiobacillus from the Hydrogenophilales to the Nitrosomonadales, proposal of Hydrogenophilalia class. nov. within the 'Proteobacteria,' and four new families within the orders Nitrosomonadales and Rhodocyclales. **Int J Syst Evol Microbiol** 2017; 67:1191-1205.

BONTEMPS C, TOUSSAINT M, REVOL P-V, HOTEL L, JEANBILLE M, *et al*. Taxonomic and functional diversity of *Streptomyces* in a forest soil. **FEMS Microbiol Lett.** 2013;342(2):157–67.

BOWMAN J. S., DUCKLOW H. W. (2015). Microbial communities can be described by metabolic structure: a general framework and application to a seasonally variable, depth-stratified microbial community from the Coastal West Antarctic Peninsula. PLoS ONE. 10, e0135868. 10.1371/journal.pone.0135868

BRUCE, Thiago *et al*. Bacterial community diversity in the Brazilian Atlantic forest soils. **Microbial ecology**, v. 60, p. 840-849, 2010.

BYBEE S. M., Bracken-Grissom H., Haynes B. D., Hermansen R. A., Byers R. L., Clement M. J., *et al*.. (2011). Targeted amplicon sequencing (TAS): a scalable next-gen approach to multilocus, multitaxa phylogenetics. Genome Biol. Evol. 3, 1312–1323. 10.evr106[pii]10.1093/gbe/evr106

Callahan BJ, McMurdie PJ, Holmes SP. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. The ISME Journal. 2017/12/01 2017;11(12):2639-2643.

CAMARGO, Antonio P. *et al*., Plant-associated microbiomes promote nutrient turnover in impoverished substrates of a biodiversity hotspot, bioRxiv 2021.07.30.454538; doi: https://doi.org/10.1101/2021.07.30.454538. ISME Journal

CANESCHI, Washington L. *et al*. Brazilian ironstone plant communities as reservoirs of culturable bacteria with diverse biotechnological potential. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1638, 2018.

CARINI, M. DELGADO-BAQUERIZO, E.-L.S. HINCKLEY, H. HOLLAND-MORITZ, T.E. BREWER, G. RUE, C. VANDERBURGH, D. MCKNIGHT, N. FIERER Effects of spatial variability and relic DNA removal on the detection of temporal dynamics in soil microbial communities mBio, 11 (2020), 10.1128/mbio.02776-19

CARMO, Flávio Fonseca do; JACOBI, Claudia Maria. A vegetação de canga no Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais: caracterização e contexto fitogeográfico. **Rodriguésia**, v. 64, p. 527-541, 2013.

CARNEIRO, Mariana Giuliani Reis. Indústria brasileira do minério de ferro: caracterização e

análise de preços no período de 2000 a 2015. Monografia (Bacharel em Economia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, p. 1-52. 2017.

Caruso V, Song X, Asquith M, Karstens L. Performance of Microbiome Sequence Inference Methods in Environments with Varying Biomass. mSystems. 2019;4(1):e00163-18.

CARVALHO FILHO, A. de. Solos e ambientes do Quadrilátero Ferrífero (MG) e aptidão Chaudhary, N., Sharma, A. K., Agarwal, P., Gupta, A. & Sharma, V. K. 16S classifier: a tool for fast and accurate taxonomic classification of 16S rRNA hypervariable regions in metagenomic datasets. PLoS ONE 10, e0116106 (2015).

CHEN, Q.-L. J. DING, D. ZHU, H.-W. HU, M. DELGADO-BAQUERIZO, Y.-B. MA, J.-Z. HE, Y.-G. ZHU. Rare microbial taxa as the major drivers of ecosystem multifunctionality in long-term fertilized soils Soil Biology and Biochemistry, 141 (2020), p. 107686,

Chilima BZ, Clark IM, Floyd S, Fine PE, Hirsch PR (2006). Distribution of environmental mycobacteria in Karonga District Northern Malawi. Appl. Environ. Microbiol. 72: 2243-2250

Chung D, Young J, Cha M, Brunecky R, Bomble Y, Himmel M *et al*. (2015) Expression of the *Acidothermus cellulolyticus* E1 endoglucanase in *Caldicellulosiruptor bescii* enhances its ability to deconstruct crystalline cellulose. *Biotechnol Biofuels* **8**: 113.

CIPRIANI HN, SOUSA H DE, MACHADO ELM, GONZAGA APD, CARVALHO LC DA S, OLIVEIRA-FILHO AT DE. Distribuição Espacial e Altura de Espécies Rupestres Camponesas Colhidas em Comunidades Preservadas e Cultivadas. Ambiente Florestal [Internet]. 2016Jan;23(1):43–51.

CNQ- Confederação Nacional do Ramo Químico. **Panorama: Setor de Minérios**. Disponível em: <http://cnq.org.br/system/uploads/publication/0572559c3a88b3c82ccd854b33cf70be/file/setor-minerios-b.pdf>. Acesso em: 11 de dezembro de 2021.

COLMAN DR, TOOLSON EC, TAKACS-VESBACH CD. Do diet and taxonomy influence insect gut bacterial communities? **Mol Ecol.** 2012;21:5124–37.

CONRAD R. Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H2, CO, CH4, OCS, N2O, and NO). **Microbiol Rev.** 1996 Dec;60(4):609-40. doi: 10.1128/mr.60.4.609-640.1996. PMID: 8987358; PMCID: PMC239458

CORRÊA, Felipe Borim. Estabelecimento de um pipeline para identificação de Mycobacterium leprae em microbiomas através do gene rRNA 16S. 2017.

COSTA, Isa Rebecca Chagas da Proteômica de solos de quatro fitofisionomias associadas à cangas ferruginosas da Serra dos Carajás. / Isa Rebecca Chagas da Costa - Belém-PA, 2018. 70 f.: il.

COSTA, Paulo Henrique de Oliveira *et al*. Non-specific interactions of rhizospheric microbial communities support the establishment of Mimosa acutistipula var. ferrea in an Amazon rehabilitating mineland. **Processes**, v. 9, n. 11, p. 2079, 2021.

COSTA, S.A.D. Caracterização química, física, mineralógica e classificação de solos ricos

em ferro do Quadrilátero Ferrífero. Dissertação (Mestrado). UFV, Viçosa, MG. 2003. 71p.

CUNHA, Izadora de Cássia Mesquita da. **Efeito da inoculação de bactérias no microbioma da rizosfera de feijão comum (Phaseolus vulgaris) e na promoção de crescimento**. 2023. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

DE QUEIROZ, Rubens Teixeira *et al*. Extending the limits of Campos Rupestres in Brazil. **Caminhos Geogr.**, v. 22, p. 115-137, 2021.

DE SOUZA RIBEIRO, Luanna; DE ANDRADE FRANCO, José Luiz; DE ALMEIDA CUNHA, André. O título de Patrimônio Natural da Humanidade e a conservação da biodiversidade: o caso do Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, v. 56, 2021.

DEINER, K. *et al*., 2017. Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. Molecular Ecology 26(21), 5872–5895.

DIAS, Jordania Cristina dos Santos. Avaliação da dinâmica de infiltração e caracterização das cangas de Capão Xavier, Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais. 2021.

DOCHERTY, K. M., BORTON, H. M., ESPINOSA, N., GEBHARDT, M., GIL-LOAIZA, J., GUTKNECHT, J. L., *et al*. (2015). Key edaphic properties largely explain temporal and geographic variation in soil microbial communities across four biomes. PLoS One 10:e0135352. doi: 10.1371/journal.pone.0135352

EDGAR RC. Accuracy of microbial community diversity estimated by closed- and open-reference OTUs. **PeerJ.** 2017;5:e3889.

EMERSON D, RENTZ JA, LILBURN TG, DAVIS RE, ALDRICH H, CHAN C, MOYER CL. A Novel Lineage of Proteobacteria Involved in Formation of Marine Fe-Oxidizing Microbial Mat Communities. **PLoS One** 2007; 2:e667.

EREN, A. M. *et al*. Minimum entropy decomposition: Unsupervised oligotyping for sensitive partitioning of high-throughput marker gene sequences. ISME J. 9, 968–979 (2014).

GAGEN, Emma J. *et al*., Biogeochemical processes in canga ecosystems: Armoring of iron ore against erosion and importance in iron duricrust restoration in Brazil. **Ore Geology Reviews.** Volume 107, April 2019, Pages 573-586. Ore Geology Reviews.

GARRITY GM, HOLT JG. **The Road Map to the Manual.** In: Garrity GM, Boone DR, Castenholz RW (eds), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition, Volume 1, Springer, New York, 2001, p. 119-169.

GEVERS D, KNIGHT R, PETROSINO JF, *et al*. The Human Microbiome Project: a community resource for the healthy human microbiome. **PLoS Biol**. 2012;10(8):e1001377-e1001377.

GONÇALVES, Thamyres Sabrina; MARIA DAS DORES, M. Veloso; FERNANDES, Geraldo W. Uso do google earth na definição de áreas prioritárias para pesquisa nos campos rupestres ferruginosos do parque estadual da serra do rola-moça. **Acta Scientiae et**

Technicae, v. 9, n. 2, 2022.

GONTIJO, Bernardo Machado. Uma geografia para a Cadeia do Espinhaço. **Megadiversidade**, v. 4, n. 1-2, p. 7-14, 2008.

GORBUSHINA, A. (2007). Life on the rocks. Environ. Microbiol. 9, 1613–1631.

GUAZZARONI, M. E. **Metagenômica abre caminho para avanços em inúmeras áreas**. cnpem, 2018. Disponível em: <https://cnpem.br/metagenomica-abre-caminho-para-avancos-em-inumeras-areas/>. Acesso em: 04 jan. 2022.

GUO Z, ZHANG H, LI J, CHEN T, WANG H, ZHANG Y (2023) Distribution of soil microorganisms in different complex soil layers in Mu Us sandy land. PLoS ONE 18(4): e0283341. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0283341

HANADA S. (2014). **The phylum Chloroflexi, the family Chloroflexaceae, and the related phototrophic families Oscillatoriaceae and Roseiflexaceae**, in The Prokaryotes-Other Major Lineages of Bacteria and the Archaea, ed. Rosenburg E. (Berlin: Springer-Verlag;), 515–532. 10.1007/978-3-642-38954-2_165

INSITITUTO PRISINOS. Geomorfologia – Cangas .2020. https://institutopristino.org.br/cangas-conhecer-e-preservar/. Acesso em: 10 de ago. 2023.

IVANOVA AA, KIM Y, WEGNER CE, LIESACK W, & DEDYSH SN (2016) Identification of microbial populations driving biopolymer degradation in acidic peatlands by metatranscriptomic analysis. **Mol Ecol 25**: 4818–4835.

JACOBI, Claudia M. *et al*. Interações ecológicas em ambientes de canga do quadrilátero ferrífero, Minas Gerais. **Geossistemas Ferruginosos do Brasil: áreas prioritárias para conservação da diversidade geológica e biológica, patrimônio cultural e serviços ambientais. Belo Horizonte, Brazil, 3i Editora**, v. 1, p. 411-428, 2015.

JACOBI, Claudia Maria; CARMO, Flávio Fonseca do; VINCENT, Regina de Castro. Estudo fitossociológico de uma comunidade vegetal sobre canga como subsídio para a reabilitação de áreas mineradas no Quadrilátero Ferrífero, MG. **Revista Árvore**, v. 32, p. 345-353, 2008.

JANSSEN, P. H. (2006). Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Appl. Environ. Microbiol.** 72, 1719–1728. doi: 10.1128/AEM.72.3.1719-1728.2006

KANG, A. & LEE, T. S. **Biotechnology for Biofuel Production and Optimization** 35–71 Elsevier, 2016.

KATZ, M., HOVER, B. M. & BRADY, S. F. Culture-independent discovery of natural products from soil metagenomes. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 43, 129–141 (2016).

KLINDWORTH A., PRUESSE E., SCHWEER T., PEPLIES J., QUAST C., HORN M., *et al*. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-

generation sequencing-based diversity studies. Nucleic Acids Res. 41, e1. 10.1093/nar/gks808

KOLBEK, J. I. R. I.; ALVES, R. J. V. Impacts of cattle, fire and wind in Rocky Savannas, Southeastern Brazil. **Acta Universitatis Carolinae Environmentalica**, v. 22, p. 111-130, 2008.

KUEVER J, RAINEY FA, WIDDEL F. Class IV. Deltaproteobacteria class. nov. In: Garrity GM, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT (eds), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition, Volume 2, Part C, **Springer,** New York, 2005, p. 922.

KUMAR, Satish *et al*. Metagenomics: retrospect and prospects in high throughput age. **Biotechnology research international**, v. 2015, 2015.

Kunin V, Engelbrektson A, Ochman H, Hugenholtz P. Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. Environ Microbiol. Jan 2010;12(1):118-23.

Le Dantec C, Duguet JP, Montiel A, Dumoutier N, Dubrou S, Vincent V (2002). Chlorine disinfection of atypical mycobacteria isolated from a water distribution system. Appl. Environ. Microbiol. 68(1025): 1-32

LEMES, C. G. DE C. Diversidade metagenômica e potencial biotecnológico de cavernas de canga do Quadrilátero Ferrífero. Universidade Federal de Ouro Preto, p. 90, 2018.

LEMES, Camila Gracyelle de Carvalho. Predição metabólica e prospecção de bactérias biocontroladoras e promotoras de crescimento vegetal obtidas em cavernas ferruginosas do Quadrilátero Ferrífero como potenciais inoculantes. 2022.

LEVIN, D. *et al*. **Diversidade e paisagens funcionais na microbiota de animais selvagens**. Science, p. 103-144, 2021. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.abb5352>. Acesso em: 04 jan. 2022.

LIMA, Madson Oliveira. Propagação e crescimento de gramíneas nativas das cangas de Carajás / Madson Oliveira Lima -- Belém-PA, 2020.

LIU, Yong-Xin *et al*. A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data. **Protein & cell**, v. 12, n. 5, p. 315-330, 2021.

LOPES, Nivaldo. A educação ambiental e a luta do movimento SOS Serra da Piedade. Monografia (Especialista em Educação Ambiental) - Universidade Candido Mendes. Rio de Janeiro, p. 1-53. 2008.

LOZANO, E., GARCÍA-ORENES, F., BÁRCENAS-MORENO, G., JIMÉNEZ-PINILLA, P., MATAIX-SOLERA, J., ARCENEGUI, V., *et al*. (2014). Relationships between soil water repellency and microbial community composition under different plant species in a Mediterranean semiarid forest. J. Hydrol. Hydromech. 62, 101–107. doi: 10.2478/johh-2014-0017

MANTOVANI, Joana Daniela. Descrição da diversidade de fungos associados a formigas

Attini por método independente de cultivo. 2013.

MARCHESI J. R., RAVEL J. (2015). The vocabulary of microbiome research: a proposal. Microbiome. 3, 31. 10.1186/s40168-015-0094-5

MARTINS, Samara Azevedo de Jesus. Complexo rupestre ferruginoso em Morro do Pilar, Espinhaço Meridional de Minas Gerais: solo-vegetação e diversidade filogenética. 2021.

MATSUO, Yoshiyuki *et al*. Full-length 16S rRNA gene amplicon analysis of human gut microbiota using MinION™ nanopore sequencing confers species-level resolution. **BMC microbiology**, v. 21, p. 1-13, 2021.

MCTI, M. D. C. T. E. I. **O mais completo estudo sobre a flora das cangas de Carajás.** museu, 2017. Disponível em: <https://www.museu-goeldi.br/noticias/o-mais-completo-estudo-sobre-a-flora-das-cangas-de-carajas>. Acesso em: 04 jan. 2022.

MENEGHINE, Aylan Kener. Análise metagenômica e potencial biotecnológico de microrganismos de solo e água de uma área agrícola com adubação orgânica. 2016.

MESSIAS, Maria Cristina Teixeira Braga. Fatores ambientais condicionantes da diversidade florística em campos rupestres quartzíticos e ferruginosos no Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais. 2011.

MIOLA, Deise TB; RAMOS, Vladimir DV; SILVEIRA, Fernando AO. A brief history of research in campo rupestre: identifying research priorities and revisiting the geographical distribution of an ancient, widespread neotropical biome. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 133, n. 2, p. 464-480, 2021.

Monciardini P, Cavaletti L, Schumann P, Rohde M, Donadio S. *Conexibacter woesei* gen. nov., sp. nov., a novel representative of a deep evolutionary line of descent within the class *Actinobacteria*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003; 53:569-576 10.1099/ijs.0.02400-0

MONTEIRO, Josiane S. *et al*. DNA metabarcoding reveals compositional and functional differences in fungal communities among Amazonian canga formations. **Fungal Ecology**, v. 61, p. 101209, 2023.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e Bioquímica do Solo 2a. Lavras 2006. ISBN 85-87692-33-x

MOURÃO, Ana; STEHMANN, João Renato. Levantamento da flora do campo rupestre sobre canga hematítica couraçada remanescente na Mina do Brucutu, Barão de Cocais, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v. 58, p. 775-786, 2007.

NESME, Joseph *et al*. Back to the future of soil metagenomics. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 73, 2016.

Normand P, Benson DR (2012) Order VI Frankiales ord. nov. In: Goodfellow M, Kampfer P, Busse H-J, Trujillo ME, Suzuki KI, Ludwig W, Whitman WB (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 5, The Actinobacteria. Bergey's Manual Trust, Springer, Athens, pp 509–511.

NOTARI, Daniel Luis; ALBA, Gabriel Dall; SILVA, Scheila de Avila. Bioinformática Contexto Computacional e Aplicações. 2020.

NOVACEK, Michael J.; CLELAND, Elsa E. The current biodiversity extinction event: scenarios for mitigation and recovery. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 10, p. 5466-5470, 2001.

PEREIRA, EO, WAGNER, FH, KAMINO, LHY, & CARMO, FF DO. Mapeamento de ecossistemas de canga ameaçados na savana brasileira usando segmentação de aprendizagem profunda U-Net e imagens Sentinel-2: um primeiro passo para o planejamento da conservação. **Biota Neotropica** , 23 (1), e20221384, 2023.

PEREIRA, Manuela Corrêa. Aspectos genéticos e morfológicos das cavidades naturais da Serra Da Piedade – Quadrilátero Ferrífero/MG. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Geografia da Universidade Federal de Minas. Belo Horizonte, abril, 2012.
PEREIRA, Vanessa Maria. Diversidade, Riqueza e Composição dos Gêneros Aspergillus e Penicillium de Solos do Quadrilátero Ferrífero / Vanessa Maria Pereira. – Lavras: UFLA, 2016.

PESSOA FILHO, MAC de P. Metagenômica e sua aplicação no estudo de diversidade e função de microrganismos de solos do Cerrado. 2010.

PIERINI, C. Caracterização de Paleossolos Aluviais em Bacias Sedimentares Mesozóicas: determinação dos controles sedimentares e implicações paleoambientais. 2006. 193 f. Tese (Doutorado em Geociências) – Instituto de Geociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

PINTO, Juliana Volpi Emrich. Caracterização e identificação de bactérias diazotróficas associativas oriundas de área de mineração de ferro / Juliana Volpi Emrich Pinto. - 2017.

PIZANI, Fernanda Mara Coelho *et al*. Impactos ambientais causados pelo turismo na Serra da Piedade/MG: Propostas para educação ambiental. **IX Simpósio Brasileiro de Engenharia Ambiental. Belo Horizonte**, 2017.

Preheim, S. P., Perrott, A. R., Martin-Platero, A. M., Gupta, A. & Alm, E. J. Distribution-based clustering: Using ecology to refine the operational taxonomic unit. Appl. Environ. Microbiol. 79, 6593–6603 (2013).

Programa Interlaboratorial de Controle de Qualidade de Análise de Solo (PROFERT – MG). Disponível em: < https://labominas.com.br/controle-qualidade/profert-mg/>. Acesso em 13 de novembro de 2023.

REIS, J. S.; LOPES, I. R.; SCHAEFER, C. E. G. R.; KER, J. C.; CARVALHO FILHO, A.; SENRA, E. O. Solos ferruginosos em áreas de canga, sinclinal do gandarela, quadrilátero ferrífero (MG). XX Congreso Latinoamericano y XVI Congreso. Peruano de la Ciencia del Suelo. “EDUCAR para PRESERVAR el suelo y conservar la vida en La Tierra”. Cusco – Perú, del 9 al 15 de Noviembre del 2014. Centro de Convenciones de la Municipalidad del Cusco.

REZENDE, Lina Andrade Lobo de. Reabilitação de campos ferruginosos degradados pela atividade minerária no Quadrilátero Ferrífero. 2010.

ROESER, H. M.P.; ROESER, P.A**.** O Quadrilátero Ferrífero - MG, Brasil: aspectos sobre sua história, seus recursos minerais e problemas ambientais relacionados. **Geonomos**. v .18. n.1. p.33 - 37. 2010.

SCHAEFER, Carlos Ernesto *et al*. Solos desenvolvidos sobre canga ferruginosa no Brasil: uma revisão crítica e papel ecológico de termiteiros. **Geossistemas Ferruginosos do Brasil: áreas prioritárias para conservação da diversidade geológica e biológica. Patrimônio cultural e serviços ambientais. Belo Horizonte, 3i editora**, p. 77-102, 2015.

SCHAEFER, Carlos Ernesto GR *et al*. Geoambientes, solos e estoques de carbono na Serra Sul de Carajás, Pará, Brasil. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi-Ciências Naturais**, v. 11, n. 1, p. 85-101, 2016.

Schloss, P. D. & Westcott, S. L. Assessing and improving methods used in operational taxonomic unit-based approaches for 16S rRNA gene sequence analysis. Appl. Environ. Microbiol. 77, 3219–3226 (2011).

SHAHI, Shailesh K.; FREEDMAN, Samantha N.; MANGALAM, Ashutosh K. Gut microbiome in multiple sclerosis: the players involved and the roles they play. **Gut microbes**, v. 8, n. 6, p. 607-615, 2017.

SHARRAR, A. M. *et al*. Bacterial secondary metabolite biosynthetic potential in soil varies with phylum, depth, and vegetation type. Mbio. 11, 1–17 (2020).

SHUSTER J, REA MA, ETSCHMANN B, BRUGGER J, REITH F. Terraced Iron Formations: Biogeochemical Processes Contributing to Microbial Biomineralization and Microfossil Preservation. Geosciences. 2018; 8(12):480. https://doi.org/10.3390/geosciences8120480

SILVA, M. L. Paleossolos e Estudos Ambientais Quaternários: Discussão Teórica e Possibilidades de Aplicação. Revista Brasileira de Geografia Física 01 (2011) 090-117.

SILVA, Sibele Aryadne da. Prospecção da tolerância de bactérias isoladas da região do Quadrilátero Ferrífero a diferentes agentes tóxicos. 2020.

SILVEIRA, Adriano Lima *et al*. Novos registros de Sphaenorhynchus canga (Amphibia, Anura, Hylidae) no Quadrilátero Ferrífero em Minas Gerais, Sudeste do Brasil. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 15, n. 1, p. 19-28, 2020.
silvicultural dos Tabuleiros Costeiros. Tese (Doutorado). UFLA, Lavras, MG. 2008. 245p.

SIMON, Carola; DANIEL, Rolf. Metagenomic analyses: past and future trends. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 4, p. 1153-1161, 2011.

SIMPSON, E.H. Measurement of diversity. Nature 163: 688, 1949.

SHANNON, C.E. A mathematical theory of communication. The Bell System Technical Journal 27: 379-423, 1948.

SIQUEIRA, Jose Oswaldo *et al*. Canga biodiversity, a matter of mining. **Frontiers in plant science**, 2014.

SOUZA, C. R. G. *et al*. Quaternário do Brasil. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2014.

TEIXEIRA, AF dos S. *et al*. Arbuscular mycorrhizal fungal communities in an iron mining area and its surroundings: inoculum potential, density, and diversity of spores related to soil properties. **Ciênc Agrotecnol** 41: 511–525. 2017.

TRINDADE, Felipe Costa *et al*. Metaproteomes reveal increased capacity for stress tolerance of soil microbes in ferruginous tropical rocky outcrops. **Pedobiologia**, v. 81, p. 150664, 2020.

TRINDADE, Felipe Costa. **Metaproteômica comparativa de solos de campos rupestres ferruginosos e de áreas mineradas em recuperação**. Dissertação. PósGraduação em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária. Belém, 2019.

TURNBAUGH, Peter J.; GORDON, Jeffrey I. An invitation to the marriage of metagenomics and metabolomics. **Cell**, v. 134, n. 5, p. 708-713, 2008.

URRIAGO OSPINA, Lina Marcela. Manejo agroecológico de áreas sobre canga usando tecnologias e conhecimento tradicional. 2019.

VASCONCELOS, Josemar Moreira *et al*. Solos metalíferos: atributos químicos nas diferentes fitofisionomias da Serra Sul, Serra dos Carajás, Pará, Brasil. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi-Ciências Naturais**, v. 11, n. 1, p. 49-55, 2016.

VASCONCELOS, Marcelo Ferreira de. O que são campos rupestres e campos de altitude nos topos de montanha do Leste do Brasil? **Brazilian Journal of Botany**, v. 34, p. 241-246, 2011.

VASCONCELOS, Thais NC *et al*. Fast diversification through a mosaic of evolutionary histories characterizes the endemic flora of ancient Neotropicais mountains. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 287, n. 1923, p. 20192933, 2020.

VIANA, Pedro Lage; LOMBARDI, Julio Antonio. Florística e caracterização dos campos rupestres sobre canga na Serra da Calçada, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v. 58, p. 157-177, 2007.

VIEIRA, Carolina Silva. Análise do microbioma subgengival na periodontite. 2021. Tese de Doutorado.

VIEIRA, Caroline Krug *et al*. Microbiome of a revegetated iron-mining site and pristine ecosystems from the Brazilian Cerrado. **Applied Soil Ecology**, v. 131, p. 55-65, 2018.

Walden, L. L., Harper, R. J., Mendham, D. S., Henry, D. J., and Fontaine, J. B. (2015). Eucalyptus reforestation induces soil water repellency. Soil Res. 53, 168–177.

Wang Y, Ogawa M, Fukuda K, Miyamoto H, Taniguchi H (2004). Isolation and identification of Mycobacteria from soil at an illegal dumping site and landfills in Japan. Microbiol. Immunol. 50: 513-524.

WHANG, K. S., LEE, J. C., LEE, H. R., HAN, S. I., CHUNG, S. H. (2014). Terriglobus tenax sp. nov., an exopolysaccharide-producing acidobacterium isolated from rhizosphere soil of a medicinal plant. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 64, 431–437. doi: 10.1099/ijs.0.053769-0

White, J. R. *et al*. Alignment and clustering of phylogenetic markers-implications for microbial diversity studies. BMC Bioinformatics 11, 152 (2010).

WILCOX, Bruce A.; MURPHY, Dennis D. Conservation strategy: the effects of fragmentation on extinction. **The American Naturalist**, v. 125, n. 6, p. 879-887, 1985.
WILLIAMS KP, KELLY DP. Proposal for a new class within the phylum Proteobacteria, Acidithiobacillia classis nov., with the type of order Acidithiobacillales, and emended description of the class Gammaproteobacteria. **Int J Syst Evol Microbiol** 2013; 63:2901-2906.

ZHANG, Y. G., CONG, J., LU, H., LI, G. L., QU, Y. Y., SU, X. J., *et al*. (2014). Community structure and elevational diversity patterns of soil *Acidobacteria*. J**. Environ. Sci.** China 26, 1717–1724. doi: 10.1016/j.jes.2014.06.012

ZIMMERMANN, J., GONZALEZ, J. M., SAIZ-JIMENEZ, C., AND LUDWIG, W. (2005). Detection and phylogenetic relationships of highly diverse uncultured *Acidobacteria*l communities in altamira cave using 23S rRNA sequence analyses. **Geomicrobiol. J.** 22, 379–388. doi: 10.1080/01490450500248986

ZHANG M., JIANG D., YANG M., MA T., DING F., HAO M., CHEN Y., ZHANG C., ZHANG X., LI M. Influence of the environment on the distribution and quality of Gentiana dahurica Fisch. **Front. Plant Sci.** 2021;12:706822. doi: 10.3389/fpls.2021.706822.

WANG Z., CHEN Z., KOWALCHUK G.A., XU Z., FU X., KURAMAE E.E. Succession of the resident soil microbial community in response to periodic inoculations. **Appl. Environ. Microbiol.** 2021;87:e00046-21. doi: 10.1128/AEM.00046-21.

WHITE, J. R. *et al*. Alignment and clustering of phylogenetic markers-implications for microbial diversity studies. **BMC Bioinformatics** 11, 152 (2010).