



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
INSTITUTO TECNOLÓGICO VALE
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA APLICADA À AGROPECUÁRIA

SAYURE MARIANA RAAD NAHON

**FERRAMENTAS MOLECULARES PARA AVALIAÇÃO DA SAÚDE DO SOLO EM
SISTEMAS AGROFLORESTAIS DA RESERVA NATURAL VALE**

BELÉM, PA

2023

SAYURE MARIANA RAAD NAHON

**FERRAMENTAS MOLECULARES PARA AVALIAÇÃO DA SAÚDE DO SOLO EM
SISTEMAS AGROFLORESTAIS DA RESERVA NATURAL VALE**

Dissertação apresentada ao curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária da Universidade Federal Rural da Amazônia, como requisito para a obtenção do Título de Mestre.

Área de Concentração: Biotecnologia aplicada ao metabolismo.

Orientador: Dr. Rafael Borges da S. Valadares.

BELÉM, PA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Bibliotecas da Universidade Federal Rural da Amazônia
Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)-

N153f Nahon, Sayure Mariana Raad

Ferramentas Moleculares para Avaliação da Saúde do Solo em Sistemas Agroflorestais da Reserva Natural Vale / Sayure Mariana Raad Nahon. - 2023.
64 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) - Programa de PÓS-GRADUAÇÃO em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (PPGBAA), Campus Universitário de Belém, Universidade Federal Rural Da Amazônia, Belém, 2023.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Borges da Silva Valadares

1. biodiversidade do solo. 2. ciclagem de nutrientes. 3. saúde do solo. I. Valadares, Rafael Borges da Silva, *orient.* II. Título

CDD 576.1192

SAYURE MARIANA RAAD NAHON

**FERRAMENTAS MOLECULARES PARA AVALIAÇÃO DA SAÚDE DO SOLO EM
SISTEMAS AGROFLORESTAIS DA RESERVA NATURAL VALE**

Dissertação apresentada ao curso de mestrado do Programa de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária da Universidade Federal Rural da Amazônia, como requisito para a obtenção do Título de Mestre.

Aprovado em 24 de Fevereiro de 2023

BANCA EXAMINADORA:



Orientador
Dr. Rafael Borges da S. Valadares
(Instituto Tecnológico Vale)

Documento assinado digitalmente
 **MARCUS DE BARROS BRAGA**
Data: 27/03/2023 11:50:23-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>
Dr. Marcus De Barros Braga
(Universidade Federal Rural da Amazônia)


Dra. Giselle Gomes Monteiro Fracetto
(Universidade Federal Rural de Pernambuco)
Documento assinado digitalmente
 **SILVIA FERNANDA MARDEGAN**
Data: 28/03/2023 09:24:04-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dra. Sílvia Fernanda Mardegan
(Universidade Federal do Pará)

“Pois sabendo que o senhor estava comigo, criei coragem.”

Esdras 7:28

RESUMO

Solos saudáveis são a base de uma agricultura sustentável e proteção de mudanças climáticas no planeta. O estudo da diversidade funcional microbiana através da aplicação de técnicas moleculares em diferentes manejos do solo pode colaborar para avaliação da saúde do solo. Esta pesquisa demonstra como as ferramentas moleculares contribuem para a avaliação da saúde do solo em sistemas agroflorestais da Reserva Natural Vale. O estudo foi realizado na Reserva Natural da Vale, localizada no município de Linhares, no Estado do Espírito Santo. Cinco sistemas de cultivo foram selecionados, a saber, sistema agroflorestal em implantação (SAF); plantio de cacau sob mata nativa raleada (CAB), também chamado de cabruca; consórcio de seringueira e cacau (SC); pastagem (PAS) e floresta nativa (MN), que foi utilizada como referência. Abordagens metagenômicas (*Metabarcoding* e *Shotgun*) e metaproteômica foram utilizadas para acessar a diversidade microbiana e suas funções. A metagenômica revelou o potencial funcional e a diversidade das comunidades microbianas. Por outro lado, a metaproteômica apontou os processos biológicos que ocorreram em um ambiente, por meio das proteínas expressadas pelos microrganismos. Os resultados indicaram uma maior similaridade entre as áreas de CAB e SC, apresentando maior diversidade de microrganismos, genes e proteínas que participam da fixação do carbono, contribuindo para a saúde do solo. A adubação verde proporcionou maior abundância de processos relacionados a transformações do nitrogênio no solo na área de sistema agroflorestal em implantação, porém proteínas relacionadas à fixação de carbono (C) estão mais presentes em áreas de SAF mais maduros (SC e CAB). Manejos mais conservativos estão associados a maior fixação de C ao longo do tempo. Foi possível demonstrar que ferramentas moleculares integradas fornecem um diagnóstico profundo sobre o estado funcional do solo. Genes e proteínas relacionadas aos ciclos do carbono e nitrogênio (N) podem incorporar índices avançados de saúde do solo e direcionar o manejo para aumentar a produtividade, melhorar métricas de diversidade e incrementar a fixação de C no solo.

Palavras-chaves: biodiversidade do solo; ciclagem de nutrientes; saúde do solo.

ABSTRACT

Healthy soils are the basis of sustainable agriculture and climate change protection on the planet. The study of microbial functional diversity through the application of molecular techniques in different soil managements can contribute to the assessment of soil health. This research demonstrates how molecular tools contribute to the assessment of soil health in agroforestry systems at the Vale Natural Reserve. The study was carried out in the Vale Natural Reserve, located in the municipality of Linhares, in the state of Espírito Santo. Five cropping systems were selected, namely, agroforestry system under implementation (SAF); cocoa plantation under thinned native forest (CAB), also called cabruca; consortium of rubber trees and cocoa (SC); pasture (PAS) and native forest (MN), which was used as a reference. Metagenomic approaches (*Metabarcoding* and *Shotgun*) and metaproteomics were used to access microbial diversity and its functions. Metagenomics revealed the functional potential and diversity of microbial communities. On the other hand, metaproteomics pointed out the biological processes that occurred in an environment, through the proteins expressed by microorganisms. The results indicated a greater similarity between the areas of CAB and SC, showing a greater diversity of microorganisms, genes and proteins that participate in carbon fixation, contributing to soil health. Green manure provided a greater abundance of processes related to the transformation of nitrogen in the soil in the area of the agroforestry system under implementation, but proteins related to carbon fixation (C) are more present in more mature AFS areas (SC and CAB). More conservative managements are associated with greater C fixation over time. It was possible to demonstrate that integrated molecular tools provide a deep diagnosis on the functional state of the soil. Genes and proteins related to the carbon and nitrogen (N) cycles can incorporate advanced indices of soil health and direct management to increase productivity, improve diversity metrics and increase C fixation in the soil.

Keywords: soil biodiversity; nutrient cycling; soil health.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Localização da área de coleta.	10
Figura 2- Atributos de fertilidade dos solos estudados.....	15
Figura 3- Análise de agrupamento por similaridade de A) comunidades bacterianas (gene 16S rRNA) e B) comunidades fúngicas (ITS).....	18
Figura 4- Abundância relativa em nível de gênero das principais sequências bacterianas do gene 16S rRNA das áreas de cabruca (CAB), floresta nativa (MN), pastagem (PAS), pré-SAF (SAF) e seringueira-cacau (SC).....	19
Figura 5- Abundância relativa em nível de gênero das principais sequências fúngicas do espaço interno transcrito (ITS) em áreas de cabruca (CAB), floresta nativa (MN), pastagem (PAS), pré-SAF (SAF) e seringueira-cacau (SC).....	20
Figura 6- Índices de Shannon-Wiener (H') e Equitatividade de Pielou (J) pelo <i>Metabarcoding</i> (A e B) e sequenciamento <i>Shotgun</i> (C e D) de amostras bacterianas.....	21
Figura 7- Índices de Shannon-Wiener (H') e Equitatividade de Pielou (J) pelo <i>Metabarcoding</i> (A e B) e sequenciamento de <i>Shotgun</i> (C e D) de amostras fúngicas.	21
Figura 8- Análise diferencial bacteriana entre as áreas (A) MN: floresta nativa; (B) PAS: pastagem; (C) SAF: pré-SAF; (D) SC: seringueira-cacau; e (E) CAB: cabruca.....	22
Figura 9- Análise diferencial fúngica entre as áreas (A) PAS: pastagem; (B) SAF: pré-SAF; (C) SC: seringueira-cacau; e (D) CAB: cabruca.....	25
Figura 10- Abundância de peptídeos distribuída entre os diferentes táxons nas áreas de seringueira-cacau (SC)	27
Figura 11- Abundância de peptídeos distribuída entre os diferentes táxons nas áreas de floresta nativa (MN)	28
Figura 12- Análise de rede dos microbiomas das áreas estudadas	30
Figura 13- Análise de redundância (RDA) para abundância relativa dos metagenômas nos distintos manejos agroflorestais.....	31
Figura 14- Heatmap mostrando a abundância dos genes funcionais e vias metabólicas ligadas às transformações do Carbono (A) e Nitrogênio (B) nos solos estudados	33
Figura 15- Abundância de enzimas entre as áreas SC (seringueira-cacau), MN (floresta nativa), SAF (pré-SAF) e PAS (pastagem)	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Caracterização das áreas de coleta da Reserva Natural Vale	11
Tabela 2- <i>Primers</i> utilizados por tipo de abordagem e os respectivos ciclos de amplificação.	12
Tabela 3- Propriedades das análises de rede dos microbiomas das áreas estudadas.	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C- Carbono

CAB- Sistema Agroflorestal Cabruca

CO₂- Dióxido de Carbono

DNA- Ácido desoxirribonucleico

ITS- Espaçadores Transcritos Internos

LCA- Lowest Common Ancestor (Menor Ancestral Comum)

MO- Matéria Orgânica

MN- Floresta Nativa de referência

N- Nitrogênio

O₂- Oxigênio

NCBI- Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia

PAS- Pastagem

PCR- Proteína C Reativa

PSMs- Correspondências de Espectro de Peptídeos

rRNA-Ácido ribonucleico ribossômico

RNV- Reserva Natural Vale

SAF- Sistema Agroflorestal em Implantação

SAFs- Sistemas Agroflorestais

SC- Sistema Agroflorestal de Seringueira-Cacau

SOC- Carbono Orgânico do Solo

SAFs- Sistemas Agroflorestais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. OBJETIVO GERAL	3
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3. REFERENCIAL TEÓRICO	4
3.1. SAÚDE DO SOLO	4
3.2. DIVERSIDADE MICROBIANA E A SAÚDE DO SOLO	5
3.3. EFEITOS DO MANEJO DO SOLO NA ATIVIDADE DA MICROBIOTA	6
3.4. CARBONO E NITROGÊNIO NO SOLO	6
3.5. METAGENÔMICA E METAPROTEÔMICA	7
4. METODOLOGIA	10
4.1. Áreas de localização e coletas	10
4.2. Caracterizações das áreas de coleta	11
4.3. Análises físico-químicas do solo	11
4.4. Análises moleculares	11
4.4.1. <i>Metabarcoding</i> e <i>Shotgun</i>	11
4.4.2. Metaproteômica	13
4.4.3. Análise de dados	13
5. RESULTADO E DISCUSSÃO	14
5.1. Propriedades físico-químicas do solo	14
5.2. Diversidades de fungos e bactérias baseadas em DNA	17
5.3. Índice de diversidade	20
5.4. Distribuição da diversidade microbianas nas áreas de estudo	22
5.5. Análise de rede	29
5.6. Relação entre comunidades microbianas e propriedades ambientais	31
5.7. Genes e vias metabólicas relacionadas à ciclagem de carbono e nitrogênio observados nos diferentes manejos	33
5.8. Abundância de enzimas	34
6. CONCLUSÕES	37
7. REFERÊNCIAS	38

1. INTRODUÇÃO

De acordo com o Painel Técnico Intergovernamental sobre Solos (ITPS), a saúde do solo é definida como “a capacidade do solo de sustentar produtividade, diversidade e o meio ambiente serviços dos ecossistemas terrestres”, sendo, portanto um elemento chave para a produção de alimentos, contribuindo no aumento da segurança alimentar, reduzindo a pobreza, desnutrição, combatendo as mudanças climáticas e fornecendo serviços ecossistêmicos essenciais (FAO, 2022). No entanto, alterações no solo podem promover a modificação da estrutura e atividade biológica. Com isso, o estudo do impacto do manejo do solo é fundamental para o desenvolvimento de sistemas agrícolas sustentáveis (CARNEIRO *et al.*, 2009; BAVOSO *et al.*, 2010).

As características microbianas e bioquímicas são potenciais indicadores de saúde do solo por desempenharem importante papel na ciclagem do carbono e do nitrogênio, além de serem susceptíveis a alterações ambientais (KENNEDY; PAPENDICK, 1995; NANNIPIERI *et al.*, 1990). Pesquisadores denotam que a saúde do solo e a microbiota estão diretamente relacionadas (GUO *et al.*, 2020; JI *et al.*, 2020).

A compreensão da importância da composição biológica do solo nos revela o valioso papel dos microrganismos para seu funcionamento (LEMANCEAU *et al.*, 2015). Técnicas moleculares, como a metagenômica e metaproteômica, possuem o potencial de produzir indicadores de saúde do solo adequados devido às suas medições estarem ligadas aos processos ecossistêmicos (VESTERGAARD *et al.*, 2017; SIMON *et al.*, 2011; BOUCHEZ *et al.*, 2016).

A diversidade microbiana é essencial para a manutenção do funcionamento do ecossistema, pois atuam na condução dos ciclos biogeoquímicos, dentre eles, carbono e nitrogênio, que regulam a dinâmica do solo, sendo dois processos indispensáveis para a qualidade do solo. Propriedades relacionadas ao ciclo destes elementos são usadas para o diagnóstico da saúde do solo (CHEN *et al.*, 2020; GUO *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2016, BHADURI *et al.*, 2022). Os genes e proteínas podem fornecer informações a respeito do potencial funcional das atividades microbianas sob diferentes manejos (FINN *et al.*, 2020). Muchane *et al.*, (2020) revelam que sistemas agroflorestais aumentam o armazenamento de carbono (C) e nitrogênio (N) no solo.

A metagenômica tem a capacidade de gerar informações sobre o potencial funcional das comunidades microbianas do solo, permitindo entender seu comportamento em relação às

mudanças ambientais, e a importância das comunidades microbianas na ciclagem de nutrientes (HOWE *et al.*, 2016; AGUIAR-PULIDO *et al.*, 2016; CHU *et al.*, 2018). Já a metaproteômica gera informações sobre a funcionalidade das comunidades de microrganismos presentes, formando um completo quadro das relações funcionais taxonômicas de um solo em um determinado momento, identificando a dinâmica metabólica dentro e entre as espécies (TARTAGLIA *et al.*, 2020; BASTIDA *et al.*, 2009). Mediante a isso, o objetivo deste estudo foi avaliar como as ferramentas moleculares contribuem na avaliação da saúde solo em sistemas agroflorestais da Reserva Natural Vale através da diversidade funcional microbiana.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar como as ferramentas moleculares podem contribuir para a avaliação da saúde do solo em diferentes Sistemas Agroflorestais da Reserva Natural Vale.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os diferentes táxons de bactérias e fungos presentes nos distintos sistemas agroflorestais.
- Observar a abundância de genes e proteínas ligados ao ciclo do carbono e nitrogênio.
- Verificar como o manejo do solo dos sistemas agroflorestais e pastagem impacta na diversidade taxonômica e funcional das comunidades microbianas das áreas da RNV.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. SAÚDE DO SOLO

Doran e Zeiss *et al.*, (2000) definem a saúde do solo como “a capacidade do solo de funcionar como um sistema vivo vital, dentro dos limites do ecossistema e do uso da terra, para sustentar a produtividade vegetal e animal, manter ou melhorar a qualidade da água e do ar e promover a saúde vegetal e animal”. No entanto, o solo é predisposto à degradação por fatores naturais ou antropogênicos, que já afeta mais de 3 bilhões de pessoas em todo o mundo, sendo assim, a sua qualidade deve ser protegida e restaurada para a melhoria dos inúmeros serviços ecossistêmicos fornecidos (GRABER *et al.*, 1995; SINGER *et al.*, 1996; SCHOLES *et al.*, 2018).

Os termos saúde do solo e qualidade do solo são frequentemente usados como sinônimo. No entanto, a distinção entre esses conceitos ainda é obscura (RODRIGUÉZ *et al.*, 2020). Lehmann *et al.*, (2020) em seu artigo sobre conceito e perspectivas futuras da saúde do solo argumentam que a saúde do solo se diferencia por possuírem objetivos mais amplos, incluindo a saúde planetária referente aos efeitos climáticos, enquanto que a qualidade do solo retrata os serviços ecossistêmicos referentes aos humanos.

A saúde do solo possui efeitos diretos sobre a produtividade agrícola e lucratividade do agricultor, bem como efeitos indiretos por meio das mitigações das mudanças climáticas (BAGNALL *et al.*, 2021). Há quatro principais serviços ecossistêmicos que movem a gestão da saúde do solo, são eles: produção sustentável de plantas, controle da qualidade da água, avanço da saúde humana e mitigação das mudanças climáticas, que possuem relação direta com o manejo do solo, pois devem ser considerados (LEHMANN *et al.*, 2020).

Os solos contêm mais de 25% da biodiversidade total do mundo. Um solo saudável possui alta biodiversidade contendo uma ampla gama de microrganismos que interagem entre si, para processar carbono e nutrientes (FAO, 2020). No âmbito da agropecuária, o solo é responsável pelo fornecimento de nutrientes, água, sustentação e manutenção de plantas e animais. No entanto, para que este exerça suas funções é indispensável que o mesmo esteja saudável e em equilíbrio com o ecossistema (BARBOSA *et al.*, 2020).

Tahat *et al.*, (2020) expõem que a identificação da saúde do solo é imprescindível para o desenvolvimento sustentável dos sistemas agrícolas. Os mesmo autores afirma que a atividade dos microrganismos é um dos componentes principais da saúde do solo, tendo em vista que esta intimamente relacionada a uma agricultura sustentável.

3.2. DIVERSIDADE MICROBIANA E A SAÚDE DO SOLO

A biomassa microbiana do solo é a porção ativa da matéria orgânica e inclui organismos com volume corporal inferior a $5 \mu\text{m}^3$ como microalgas, arqueas, bactérias, fungos e alguns membros da microfauna, como os protozoários (JENKINSON; LADD, 1981). Porém, seu tempo de permanência no solo é pequeno em relação aos outros componentes orgânicos, em média, a cada 3 meses a biomassa é renovada (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A ciclagem de nutrientes é dependente da abundância dos microrganismos decompositores presentes no solo (FIRME, 2005), pois os mesmos aumentam a viabilidade dos nutrientes por meio de processos exclusivos, como a fixação biológica de nitrogênio, a solubilização de fosfatos ou a biodisponibilidade de nutrientes (RASHID *et al.*, 2016). De acordo com Kraft *et al.* (2021), solos com maior diversidade geralmente apresentam uma maior capacidade de ciclagem de nutrientes, decomposição da matéria orgânica e estruturação do solo.

Dentro das comunidades de microrganismos estão os fungos e bactérias, possuindo importante papel na manutenção e bom funcionamento do bioma, além de se relacionarem com plantas e animais, participam do ciclo do carbono e nitrogênio, facilitam a decomposição da matéria orgânica, contribuem para a fertilidade do solo, e produzem vários metabólitos secundários que são importantes para o ambiente ecológico do solo (ALTIERI, 1999; ULLAH *et al.*, 2019; ŽIFČÁKOVÁ *et al.*, 2016; BUSCOT, 2005; CHEN *et al.*, 2020).

Por essa razão, mudanças na comunidade microbiana do solo são indicadores dos efeitos de estresse ou fatores de perturbação, com isso podem ser detectadas rapidamente pela biomassa microbiana por esta ser integrante do compartimento da matéria orgânica, o qual é influenciado de forma direta por fatores abióticos e bióticos (GIUDITTA *et al.*, 2020; GAMA-RODRIGUES *et al.*, 2005).

Entre os principais indicadores microbiológicos e bioquímicos, estão: os grupos microbianos funcionais (amonificadores, celulolíticos, desnitrificadores, fixadores de N, nitrificadores, proteolíticos e solubilizadores de fosfato), o C e os nutrientes contidos na biomassa microbiana do solo, a taxa respiratória do solo e a atividade de enzimas-chaves envolvidas na ciclagem de C e nutrientes (BATISTA *et al.*, 2018).

3.3. EFEITOS DO MANEJO DO SOLO NA ATIVIDADE DA MICROBIOTA

O microbioma desempenha um papel fundamental em todos os processos do solo, tendo em vista que a abundância, atividade e composição microbiana são fatores contribuintes para a produtividade agrícola sustentável (BARRIOS, 2007; VAN DER HEIJDEN *et al.*, 2008). Porém, o uso diferenciado da terra provoca modificações nas propriedades do solo, decorrentes das perturbações antrópicas e cobertura vegetal (AHMED *et al.*, 2012).

Os microrganismos vivem em constante interação, pois além de interagirem com outros organismos, interagem com o ambiente, possuindo uma grande diversidade metabólica, sendo os principais catalizadores das ciclagens de nutrientes (MADIGAM *et al.*, 2010). Powlson *et al.*, (1997) discorrem que a função dos microrganismos é mediar os processos no solo relacionados ao manejo, e mantendo essa relação direta, são efetivos indicadores de saúde do solo, tendo em vista que os mesmos possuem capacidade rápida de resposta a qualquer alteração no manejo.

Moreira e Siqueira (2006) relatam que o tipo de manejo promove alterações em suas propriedades, afetando por consequente a atividade microbiana e o potencial de uso do solo para cultivo. Nesse sentido, o tipo de manejo aplicado altera a quantidade e diversidade de microrganismos constituintes da sua microbiota, resultando em consideráveis impactos no solo (NJIRA; NABWAMI, 2013).

De acordo com Lambais *et al.*, (2005), o manejo de solo que emprega menor revolvimento e maior diversidade da cobertura vegetal, oferece maior diversidade microbiana, o que segundo Balota (2017) pode proporcionar maior qualidade e estabilidade do solo e, por assim, um sistema mais sustentável. Diversas pesquisas têm demonstrado como os diferentes manejos de solo podem afetar a microbiota do solo, especialmente os seus grupos funcionais (BERNARDES; SANTOS, 2006).

3.4. CARBONO E NITROGÊNIO NO SOLO

A insegurança alimentar é um dos maiores desafios que o mundo enfrenta, e o solo é um recurso natural imprescindível, tendo em vista que direta ou indiretamente, cerca de 98% dos alimentos advêm deste. (DALAL *et al.*, 2021; LAL *et al.*, 2021). Além de serem indicadores de qualidade do solo, o carbono e nitrogênio podem contribuir para a redução do de gases do efeito estufa (NATH *et al.*, 2017).

Segundo Martin *et al.*, (2016), o carbono no solo pode ficar acumulado por décadas, tendo a sua permanência mais durável do que na biomassa vegetal, tornando através dessa característica, o solo como o maior reservatório de carbono. No entanto, devido a sua

capacidade de armazenamento, uma pequena variação pode levar a uma grande flutuação no CO₂ atmosférico (YANG *et al.*, 2018).

Mundialmente, os solos armazenam quatro vezes mais carbono orgânico quando em comparação com a biosfera, e duas a três vezes mais C do que a atmosfera. Com isso, mudanças no manejo e uso da terra possuem o potencial de produzir grandes efeitos nos balanços de C, podendo gerar consequências nas mudanças climáticas (CHEN *et al.*, 2018).

Os estoques de C no solo estão sendo amplamente perdidos por meio de mudanças no uso da terra e práticas insustentáveis de manejo florestal e agrícola (JACKSON *et al.*, 2017) sendo assim, a conservação do solo aliada a uma agricultura sustentável é uma opção válida para a contribuição no armazenamento do C, reduzindo em alguns casos a perda de CO₂ (MARTÍNEZ-MENA *et al.*, 2021; JIA *et al.*, 2021).

O nitrogênio é um dos elementos necessários para a vivência de todos os organismos vivos, compondo 78,09 % da atmosfera (MAHMUD *et al.*, 2021). Sua existência no solo é principalmente na forma de compostos orgânicos, e sua transformação no ambiente é conhecida como ciclo do nitrogênio, que incluem sua fixação, assimilação, nitrificação e desnitrificação (HIRSCH; MAUCLINE, 2015; PASHAEI *et al.*, 2022).

O setor agrícola é um dos maiores contribuintes para as emissões de óxido nitroso, sendo a principal rota de emissão a aplicação de fertilizantes nitrogenados e a deposição de esterco animal (GROSSI *et al.*, 2018; FLECHARD *et al.*, 2007). A nitrificação e a desnitrificação são os principais processos que estimulam a liberação de gases de efeito estufa, aumentando o potencial de aquecimento de CO₂ em 298 vezes (CLAGNAN *et al.*, 2020; JANSSON; HOFMOCKEL, 2020).

3.5. METAGENÔMICA E METAPROTEÔMICA

Em 1986, Pace *et al.*, (1986) tiveram a ideia de clonar DNA diretamente das amostras ambientais com o intuito de analisar o complexo mundo das populações microbianas naturais. Os autores usaram como estratégia a clonagem *shotgun* de gene 16S rRNA utilizando o DNA purificado das amostras. Com isso, inferiram que apesar do DNA ser originado de uma população variada de microrganismos, foi possível realizar a recuperação e sequenciamento dos genes de rRNA individuais (ALVES *et al.*, 2018).

A metagenômica é um campo que combina elementos de biologia molecular e genética a qual permite identificar e caracterizar microrganismos do solo através de análises de materiais genéticos isolados diretamente das amostras (BHAT, 2013). Shrinivas *et al.*, (2019) complementa que uma das funções da metagenômica também é fornecer informações

sobre os microrganismos, de forma a compreender suas distintas funções dentro de um ecossistema.

Ao realizar a extração do DNA, duas abordagens podem ser utilizadas na metagenômica: *metabarcoding* e *shotgun*. Na abordagem *metabarcoding*, a estratégia usada é um iniciador que amplifica uma sequência conservada em regiões específicas do grupo de interesse microbiológico. Já em *shotgun*, todos os genomas presentes nas amostras são sequenciados (PAVAN-KUMAR *et al.*, 2015; ACINAS *et al.*, 2004).

De acordo com Mocali *et al.*, (2010) a metagenômica é uma ferramenta importante para o estudo de solos, uma vez que é poderosa para avaliar a complexa diversidade das comunidades microbianas, fornecendo o conhecimento para compreender sua ecologia. Além disso, pode fornecer subsídios para a biotecnologia e agricultura de novas espécies, genes ou moléculas que são relevantes para a biotecnologia e aplicações agrícolas. Steele e Streit (2005) relatam que há uma série de informações possíveis de serem obtidas através das análises metagenômicas, seja voltadas a presença de microrganismos específicos ou dominantes de um ambiente, composição microbiana de determinadas comunidades, e até mesmo a existência de rotas metabólicas ou identificação de genes.

A diversidade microbiana em ambientes tem sido estudada pela análise de genes, considerados “relógios moleculares”, como os RNAs ribossômicos 16S rRNA, 18S rRNA e os espaçadores transcritos internos (ITS) pelo fato de estes apresentarem regiões conservadas, as quais podem ser usadas para comparar e classificar a taxonomia dos microrganismos (GOULART *et al.*, 2022).

Wilmes e Bond (2004) propuseram o termo 'metaproteômica' para a caracterização em grande escala de todo o complexo de proteínas da microbiota ambiental em um determinado momento. Os mesmos autores também relataram em seus estudos que ao determinar as proteínas que foram sintetizadas por microrganismos presentes no momento da amostragem a metaproteômica permite a reconstrução dos processos e vias metabólicas que são centrais para o funcionamento do ecossistema.

As proteínas são extraídas, isoladas e digeridas em peptídeos, separadas e analisadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS/MS), após isso, os espectros obtidos são comparados com espectro gerado *in silico* oriundos de um banco de dados de sequência de proteínas, levando a correspondências de espectro de peptídeos (PSMs). Os peptídeos então identificados são usados para inferir as proteínas presentes na amostra. Assim sendo, as proteínas podem ser anotadas com táxons e funções, fornecendo informações sobre os níveis de expressão gênica (SCHIEBENHOEFER *et al.*, 2019).

Diferentemente de algumas abordagens de sequenciamento de DNA que só podem determinar o potencial funcional pelo perfil do conteúdo de gene, a metaproteômica tem o poder de fornecer insights dos genes expressos e, assim, nos fenótipos reais no nível molecular (WILMES; BOND, 2004; BLAKELEY-RUIZ *et al.*, 2019).

A análise de proteínas de comunidades microbianas de um ambiente representa a expressão máxima do sistema biológico, proporcionando respostas fisiológicas às alterações ambientais ocorridas, além de permitir a inferência filogenética dos microrganismos envolvidos no processo (SANTOS, 2008). Além do mais, o uso de proteínas também tem o potencial de revelar a identidade dos microrganismos ativos por meio de análise de banco de dados usando o nível de homologia com outras espécies (BENNDORF *et al.*, 2007).

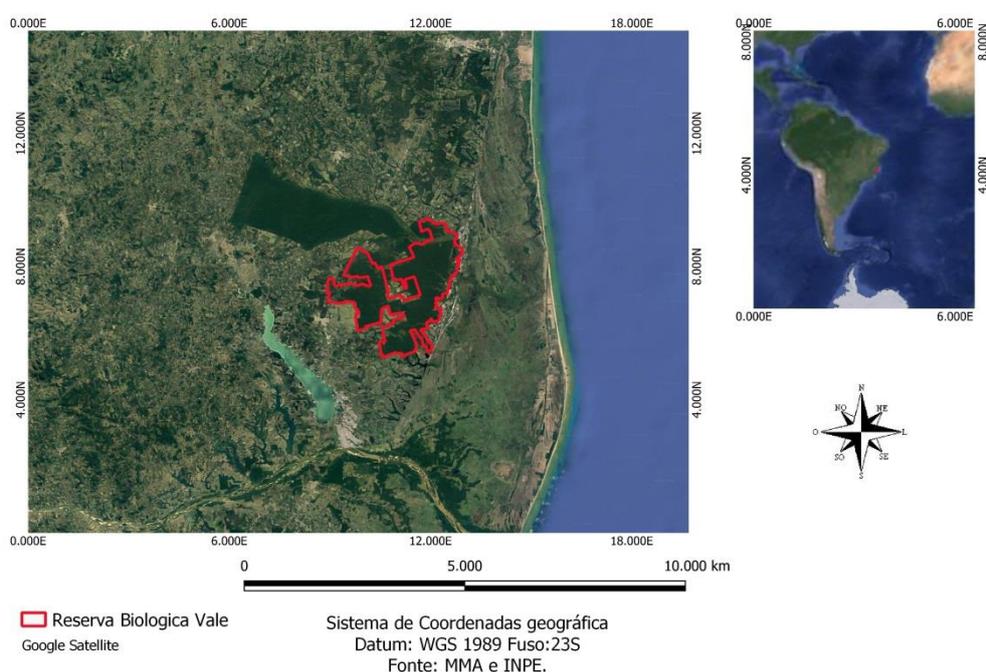
Para entender a comunicação complexa entre os microrganismos da planta e do solo, metagenômica e metatranscriptômica não são suficientes, e uma abordagem metaproteômica deve ser usada para avaliar a funcionalidade real dos microrganismos do solo na rizosfera. (WHITE *et al.*, 2017). Sendo assim, a abordagem metaproteômica nos permite analisar os dados taxonômicos, pode oferecer uma caracterização funcional da biomassa presente na rizosfera, e tem grande potencial, pois pode ajudar a identificar a dinâmica metabólica entre e dentro das espécies (TANG *et al.*, 2016).

4. METODOLOGIA

4.1. Áreas de localização e coletas

As coletas foram realizadas no ano de 2021 (análises metagenômicas) e 2022 (análise metaproteômica) na Reserva Natural Vale (Figura 1), localizada no Estado do Espírito Santo, a cerca de 30 km da sede do município de Linhares, entre as coordenadas 19°01'16" e 19°15'13"S, e 40°04'18" e 39°52'07"W (KIERULFF *et al.*, 2015).

Figura 1- Localização da área de coleta.



A área de coleta faz parte de um mosaico de áreas protegidas conhecida por sua alta diversidade biológica (PEIXOTO; SILVA, 1997). Segundo a classificação de Koppen, o clima é Aw, ou seja, tropical quente e úmido, com estação chuvosa no verão e seca no inverno. Apresentando temperatura máxima de 29,9 °C e mínima de 18,7 °C, tendo precipitação anual de 1.214,6 mm (ALVARES *et al.*, 2013; SAITER *et al.*, 2017). A Reserva Natural Vale está inserida no bioma Mata Atlântica, compreendendo um dos maiores blocos de Floresta de Tabuleiro, onde a principal vegetação é a floresta ombrófila semidecídua. Os solos da região do Tabuleiro, de modo geral, apresentam pobreza nutritiva, possuindo fragilidade do horizonte arenoso, dificultando a retenção de nutrientes (ROLIM *et al.*, 2016; PEIXOTO; GENTRY, 1990; GARAY *et al.*, 2004).

4.2. Caracterizações das áreas de coleta

Os sistemas escolhidos para a realização das coletas de solo foram sistemas cultivados com área Pré-SAF (SAF); SAF cabruca (CAB); SAF seringueira-cacau (SC); pastagem (PAS); e floresta nativa primária (MN), que foi utilizada como referência- Tabela 1. Em cada área selecionada, foram delimitadas 5 parcelas de 30x30 metros, sendo coletadas 3 amostras de cada parcela, nas profundidades de 0-5 cm, totalizando assim 15 amostras.

Tabela 1- Caracterização das áreas de coleta da Reserva Natural Vale

Sistemas de Uso	Características
Pré-SAF (SAF)	Área com implantação de SAF em andamento
Cabruca (CAB)	Lavoura de Cacau implantada sob mata nativa.
Seringueira-Cacau (SC)	Consórcio de cacau com seringueira em plena produção.
Pastagem (PAS)	Vegetação composta por gramíneas em estágio elevado de degradação.
Floresta Nativa Primária (MN)	Área com mata nativa protegida pertencente à RNV.

4.3. Análises físico-químicas do solo

As amostras foram identificadas e encaminhadas para análise de solo (pH , fósforo Mehlich, alumínio, acidez potencial, matéria orgânica, nitrogênio total, boro, cobre, ferro, manganês, zinco, cálculos de soma de bases, capacidade de troca catiônica, porcentagem por saturação de bases e porcentagem de saturação por alumínio, argila, silte e areia total) pelo Laboratório Brasileiro de Análises Ambientais e Agrícolas-LABRAS (Monte Carmelo, MG).

4.4. Análises moleculares

As análises das amostras foram realizadas no Laboratório do Instituto Tecnológico Vale- Desenvolvimento Sustentável, localizado em Belém-PA.

4.4.1. *Metabarcoding* e *Shotgun*

Na extração de DNA para os estudos de biodiversidade da comunidade microbiana foi utilizado o kit *DNeasy PowerSoil Kit* (QIAGEN, Hilden, Germany) de acordo com as

instruções do fabricante. As amostras foram quantificadas no fluorômetro *Qubit*® 3.0 (Thermo Fisher Scientific).

As reações de amplificação foram realizadas de acordo com Samarakoon *et al.*, (2013). Os primers utilizados e os ciclos de amplificação estão na tabela 2.

Tabela 2- *Primers* utilizados por tipo de abordagem e os respectivos ciclos de amplificação.

<i>Primers</i>		Ciclo de amplificação
S-D-Bact-0341-b-S-17-N	5'TCGTCGGCAGCGTCAGATGTG TATAAGAGACAGCCTACGGGN GGCWGCAG-3'	3 min. a 95 °C, seguida por 25 ciclos a 95 °C por 30 seg., 55 °C por 30 seg., 72 °C por 30 seg. e 72 °C por 5 min.
S-D-Bact-0785-a-A-21-N	5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGT GTATAAGAGACAGGACTACHV GGGTATCTAATCC-3'	
fITS7i	5'- TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGT ATAAGAGACAGGTGARTCATC GAATCTTTG-3'	94 °C por 2 min., seguida por 35 ciclos de 94 °C por 30 seg., 56 °C por 1 min., 72 °C por 30 seg. e 72 °C por 7 min.
ITS4i	5'- GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTG TATAAGAGACAGTCCTCCGCTT ATTGATATGC-3'	

Após a amplificação, os produtos de PCR foram purificados, seguindo o protocolo do fabricante. Posteriormente, as bibliotecas foram processadas com o Nextera XT kit (Illumina, San Diego, CA, USA). O produto de PCR foi purificado novamente, e as bibliotecas foram quantificadas no fluorômetro *Qubit* 3.0 (Thermo Fisher Scientific). A verificação dos tamanhos dos fragmentos foi realizada em TapeStation System 4200 (Agilent Technologies). A corrida de sequenciamento foi realizada utilizando o kit de corrida MiSeq V3 600 ciclos (Illumina) em plataforma Illumina MiSeq.

Para *Shotgun*, as bibliotecas foram construídas e submetidas a uma reação de fragmentação enzimática aleatória, na qual o DNA foi simultaneamente fragmentado e ligado a adaptadores específicos utilizando o kit Illumina DNA Prep (Illumina, San Diego, EUA) conforme instrução do fabricante.

Os fragmentos do DNA foram purificados utilizando AMPure XP *purification kit* (Beckman Coulter, Inc., Brea, EUA) e sujeitos a uma reação de amplificação utilizando *primers* complementares aos adaptadores da flowcell da Illumina. As bibliotecas amplificadas foram novamente purificadas usando AMPure XP *purification kit* (Beckman Coulter, Inc., Brea, EUA) e quantificadas utilizando o fluorômetro *Qubit* 3.0 (Thermo Fisher Scientific

Inc.). Os tamanhos dos fragmentos foram verificados com o fluorômetro Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies®) usando um kit de DNA de alta sensibilidade.

O sequenciamento foi realizado na plataforma NextSeq 500/550 Illumina, usando um kit NextSeq 500 v2.5 kit high-output de 300 ciclos.

4.4.2. Metaproteômica

A extração de proteínas foi realizada utilizando protocolo adaptado de Qian e Hettich (2017). O preparo para a digestão das proteínas foi realizado de acordo com Trindade *et al.*, (2021). As amostras foram analisadas em cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa de alta resolução. Os resultados das corridas das 5 amostras de cada área (SAF, SC, PAS e MN) foram combinados em uma amostra para cada área.

4.4.3. Análise de dados

Para a análise *Metabarcoding*, as *reads paired-end* foram aparadas e filtradas usando o PRINSEQ v0.20.4, mescladas usando o Paired-End reAd mergeR (PEAR) v0.9.10 e posteriormente analisadas usando o *pipeline* PIMBA (OLIVEIRA *et al.*, 2021) utilizando os bancos de dados *Ribosomal Database Project* RDP v11.5 (COLE *et al.*, 2014) para as sequências de 16S e o UNITE v8.2 (NILSSON *et al.*, 2018).

Na análise de *Shotgun*, as *reads paired-end* foram montadas em contigs usando o MEGAHIT v1.2.9. A classificação taxonômica foi realizada usando Kaiju v1.4.4. Como banco de dados de referência para a classificação taxonômica, utilizou-se as sequências de proteínas NCBI Blast não redundantes para a obtenção de informações de abundância relativa dos grupos taxonômicos (Bacteria, Archaea e Fungi).

Para a análise funcional, as *reads paired-end* foram mescladas utilizando o Paired-End reAd mergeR (PEAR) v0.9.10 e submetidas à ferramenta online Ecofun-MAP (<http://iegst1.rccc.ou.edu:8080/ecofunmap/>) (parâmetros: 10 threads; e fluxo de trabalho: ultra-sensitive).

Para a identificação e quantificação de proteínas, os dados da metaproteômica foram analisados no Software Proteinlynx, utilizando o banco de dados público de bactérias, fungos e plantas do Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) além de dados baseados nos metagenomas dos solos da RNV. As análises filogenéticas e funcionais baseadas em peptídeos foram realizadas no software Unipept 4.3 (<https://unipept.ugent.be/>).

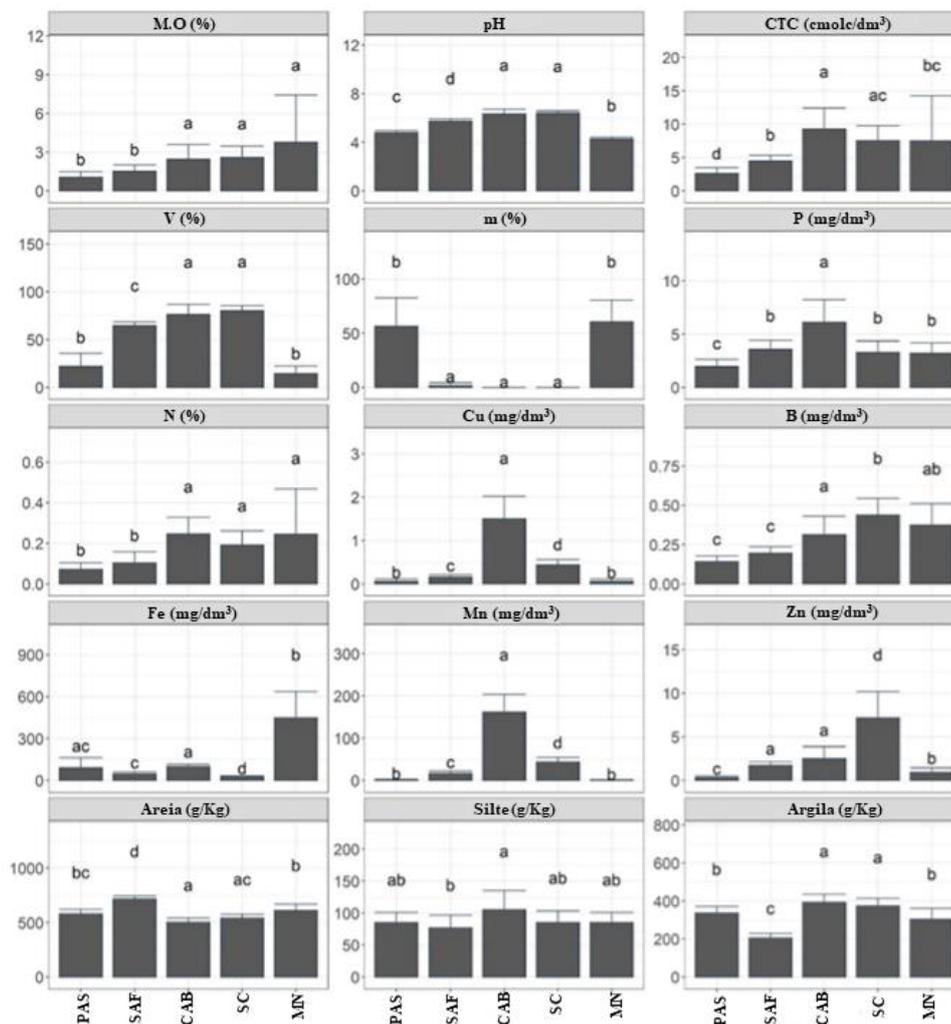
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Propriedades físico-químicas do solo

As áreas de PAS e SAF apresentaram menores acúmulos de matéria orgânica e nitrogênio, comparativamente às áreas de CAB, SC e MN (Fig.2). Os valores de pH variaram entre 4,0 e 7,2, sendo os menores valores médios encontrados para as áreas de MN e PAS. Estas duas áreas também apresentaram os maiores valores para saturação por alumínio (m) e os menores valores de saturação por bases (V). A área de CAB destacou-se em relação às demais áreas por apresentar os maiores teores de fósforo (P), manganês (Mn) e cobre (Cu). No que diz respeito à porcentagem de N, esta se apresentou maior nas áreas de MN, CAB e SC não apresentando diferença significativa entre si. Em contrapartida, as mesmas áreas apresentaram diferença para zinco (Zn).

Os solos das áreas de CAB e SC apresentam textura argilosa, enquanto as demais áreas apresentam textura média (PREZOTTI *et al.*, 2007). Verificou-se também tendência de os valores de Capacidade de Troca Catiônica (CTC) acompanhar os teores de matéria orgânica (MO), sendo maiores na área de MN.

Figura 2- Atributos de fertilidade dos solos estudados. Letras iguais sinalizam as áreas que não se diferem entre si de acordo com o teste de Kruskal Wallis, seguido pelo teste de Dunn ($p < 0.05$).



A acidez ativa (pH médio) dos solos nas áreas de CAB e SC pode ser classificada como fraca (6.0-6.9). Diferentemente das áreas de MN e PAS, as quais puderam ser classificadas como elevada (<5.0), e a área de SAF classificada como acidez média (5.0-5.9) (PREZOTTI *et al.*, 2007). Esses valores de pH consequentemente influenciaram os valores de saturação por alumínio (m%), sendo que as áreas de CAB, SC e SAF apresentaram valores baixos (<20%) e MN e PAS valores altos (> 40%). Amponsah-Doku *et al.*, (2022) destacam que altas taxas de saturação por alumínio em sistemas de cultivo de cacau são altamente prejudiciais, tendo em vista que interferem na absorção de nutrientes por reduzir o crescimento foliar e radicular.

Os valores de pH observados para a área de pastagem do presente estudo são próximos aos valores reportados por Júnior *et al.*, (2017). Esses autores avaliaram o pH do solo sob

diferentes usos da terra no Estado do Espírito Santo e observaram valor médio de pH 4.93 em áreas de pastagens. Diversos fatores podem levar a acidificação dos solos, dentre elas a compactação do solo, a qual resulta em um menor fluxo de O₂ e aumento de CO₂ no solo (MOREIRA et al.,2005). Na área de MN, a acidificação do solo pode estar relacionada à matéria orgânica, a qual ao mineralizar libera H⁺ elevando a acidez, como também ao fato de que solos tropicais tendem a serem ácidos devido à intensa lixiviação de bases (ex.: Ca, Mg, K) (LIMA et al., 2018; ALEXANDER; CRESSE et al.,1995; JOHAN et al., 2021; SOUZA et al., 2017).

Considerando os valores de saturação por bases (V), verificou-se que as práticas de manejo adotadas nos sistemas de CAB e SC possibilitaram a elevação da saturação por base a faixas consideradas adequadas para a cultura do cacauzeiro (V= 70%, irrigado-60% não irrigado) e seringueira (V= 50%) (PREZOTTI et al., 2007). Uma das práticas utilizadas para se alcançar os níveis adequados de saturação por base do solo é a aplicação de calcário, a qual eleva tanto a saturação por bases, como o pH do solo. O nível de saturação por base observado para cabruca no presente estudo foi semelhante ao reportado por De Souza et al., (2018), ao avaliarem as propriedades físico-química do solo para determinar a dinâmica do nitrogênio em áreas de MN e CAB no bioma Mata Atlântica.

Dos sistemas cultivados, apenas a área de PAS apresentou saturação por base classificada como baixa. Nessa área, encontra-se cultivada a espécie *Brachiaria* sp e os valores de saturação por base observados são 22% inferiores ao preconizado para essa espécie. De certa maneira, esse fato era esperado, visto o avançado estágio de degradação observado nessa área. As perdas de solo por erosão, a lixiviação das bases e a exportação das bases pela cultura e a ausência de práticas de manejo para a reposição dessas bases são fatores que contribuíram para os baixos níveis observados.

Dos micronutrientes avaliados, boro (B), Cu e Zn encontram-se em níveis classificados como baixo (CANTARELLA et al., 2022). Exceção é verificada para os teores de Zn no sistema SC, o qual os teores são classificados como médio (5.0-10.0). Em alguns solos a elevação do pH pode diminuir a disponibilidade de Zn (MALAVOLTA, 2006). Ferro (Fe) e Mn não representam limitação nutricional para as áreas cultivadas.

Os maiores teores de matéria orgânica foram observados para as áreas de MN, SC e CAB. Em geral, verifica-se que os agrossistemas florestais de cacau produzem alta quantidade de biomassa vegetal, fornecendo um fluxo contínuo de matéria orgânica no solo (GAMA-RODRIGUES et al., 2011). Ao avaliarem o armazenamento de carbono em diferentes sistemas agroflorestais de cacau, Monroe et al., (2016) relataram que a deposição do material

vegetal do cacau, resultou em uma espessa camada de serrapilheira, que conseqüentemente contribui no aumento da matéria orgânica.

As áreas de MN, CAB e SC também tiveram os maiores valores de N em relação às áreas de SAF e PAS. Resultado semelhante de N em áreas de floresta foi relatado por Thomazini *et al.*, (2015) ao quantificarem os efeitos de diferentes práticas de manejo em sistemas agroflorestais. Gama-Rodrigues *et al.*, (2011) expôs que sistemas agroflorestais de cacau possuem serrapilheira rica em N, o que infere a capacidade de armazenamento desse nutriente no solo.

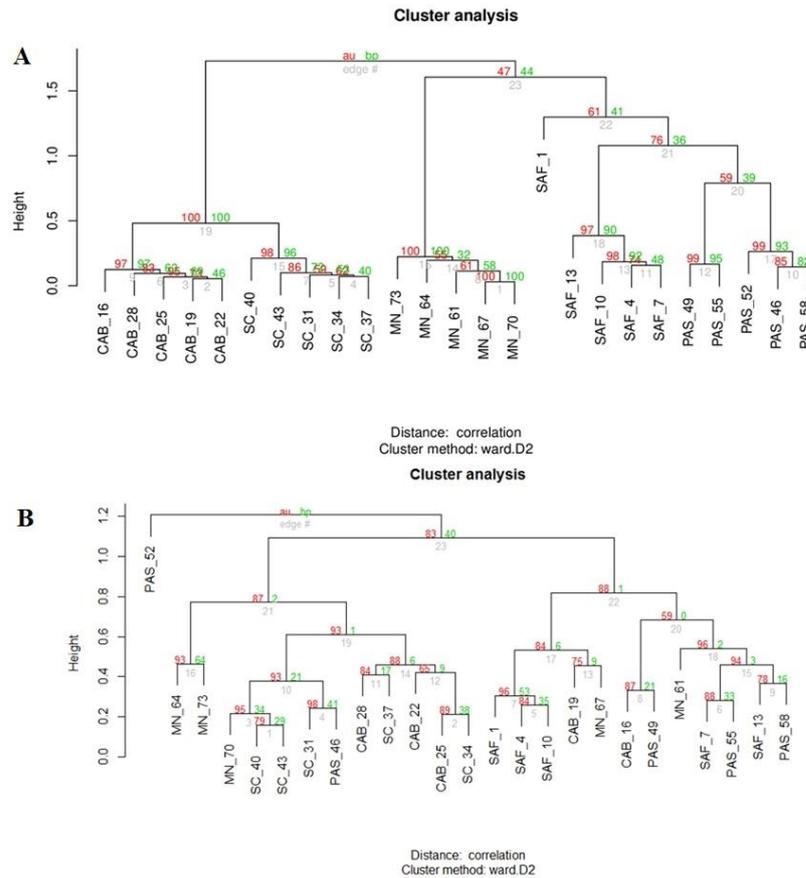
A maioria das áreas avaliadas apresentou baixo teor de P no solo, exceto CAB que apresenta teor médio (PREZOTTI *et al.*, 2007). Resultado contrário foi reportado no estudo de Aleixo *et al.*, (2019), ao qual ao determinarem o P orgânico em distintos sistemas agroflorestais de cacau comparados à PAS e MN, constataram teor de P médio apenas no sistema SC. Os mesmos autores atribuem essa diferenciação às práticas de manejo adotadas em cada área.

5.2. Diversidades de fungos e bactérias baseadas em DNA

O agrupamento por similaridade identifica subgrupos que apresentam características semelhantes dentro de uma área (ALLEN; GOLDSTEIN, 2013). Nas áreas estudadas, o agrupamento revelou que as bactérias (Figura 3-A) apresentaram agrupamento definido, destacando a semelhança entre áreas de cabruca e seringueira-cacau. As áreas de pastagem e pré-SAF apresentaram similaridade, com probabilidade em torno de 40, presente nos nós 21 e 22. Todavia, a comunidade bacteriana da área de floresta nativa, apresentou agrupamento intermediário quando comparada às demais áreas.

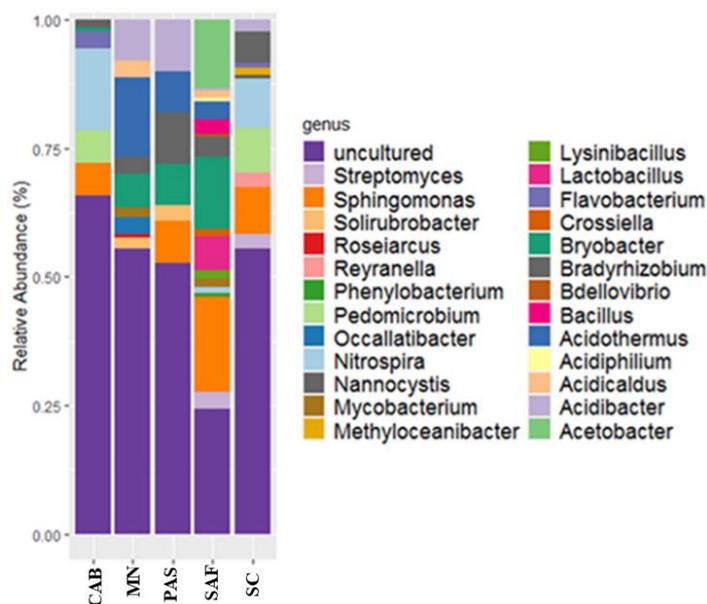
Em relação às áreas, não houve agrupamento distinto entre as áreas no agrupamento por similaridade das comunidades fúngicas (Figura 3-B).

Figura 3- Análise de agrupamento por similaridade de A) comunidades bacterianas (gene 16S rRNA) e B) comunidades fúngicas (ITS).



Ao observar a abundância relativa das comunidades microbianas em nível de gênero (Figura 4), constatou-se nas áreas de cabruca e seringueira-cacau gêneros de bactérias relacionadas ao ciclo do nitrogênio (*Bradyrhizobium* e *Nitrospira*) e metabolização de compostos orgânicos (*Pedomicrobium*) para a incorporação da matéria orgânica e acúmulo de nutrientes. Já as demais áreas apresentaram gêneros relacionados à resposta ao estresse e generalistas benéficos (*Bacillus*, *Bryobacter*, *Solirubrobacter*, *Streptomyces*) (LIU et al.,2021), mostrando dinamismo e competitividade no funcionamento desses ambientes.

Figura 4- Abundância relativa em nível de gênero das principais sequências bacterianas do gene 16S rRNA das áreas de cabruca (CAB), florestanativa (MN), pastagem (PAS), pré-SAF (SAF) e seringueira-cacau (SC).



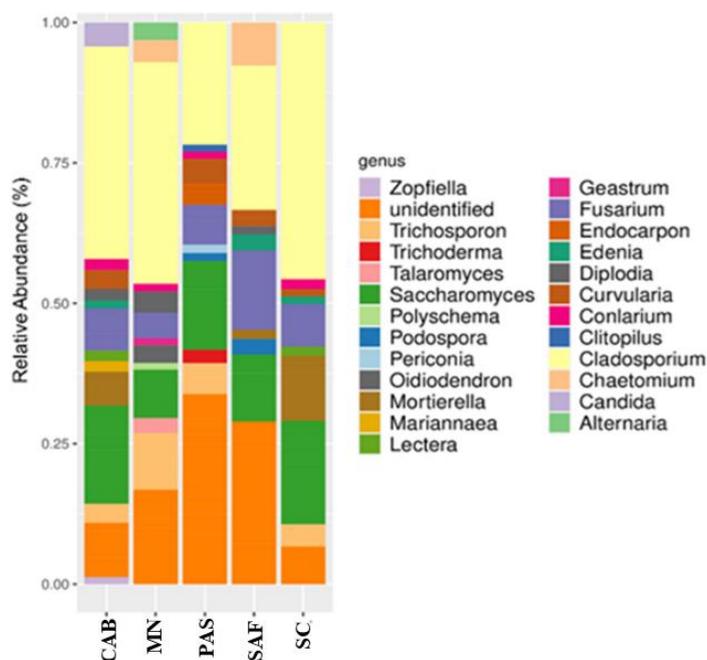
Nas áreas pré-SAF é relevante salientar a diversificação de bactérias presentes na classe *Alphaproteobacteria* e no filo *Actinobacteria*, as quais contribuem para o ciclo global do carbono (PURKAMO *et al.*, 2017). Além de gêneros de bactérias benéficas como os envolvidos na mineralização da matéria orgânica (*Bryobacter*, *Pedomicrobium* e *Sphingomonas*) e na fixação de nitrogênio (*Bradyrhizobium*) (ALVAREZ *et al.*, 2017; EICHORST *et al.*, 2018).

O filo *Actinobacteria* possui genes que codificam enzimas-chaves associadas à via Wood-Ljungdahl (WLP), que é considerada uma via de fixação do carbono (JIAN-YU *et al.*, 2021). Complementado, Trivedi *et al.*, (2013) destacam que ambientes dominados por *Actinobacterias* são promissores no armazenamento de carbono por produzirem polissacarídeos que proporcionam a estabilidade do solo. Uma das características da maioria das bactérias que compõe este filo é a degradação de substâncias complexas, sendo importantes para o melhoramento do solo (CANHOS *et al.*, 1997).

Na figura 5, é possível observar a abundância de gênero de fungos encontrada nas áreas de estudo, onde nas áreas de cabruca e seringueira-cacau foram detectados *Trichoderma*, o qual de acordo com Shida *et al.*, (2020) atua como agente de biocontrole, são promotores de crescimento e melhoram a saúde do solo. Também foram constatados nessas áreas e no pré-SAF fungos que pertencem ao gênero *Mortierella*, ao qual são promotores de

crescimento de plantas, e detém a capacidade funcional de degradar uma variedade de orgânicos tóxicos, melhorando assim, a saúde do solo (OZIMEK *et al.*,2020; LI *et al.*,2018).

Figura 5- Abundância relativa em nível de gênero das principais sequências fúngicas do espaço interno transcrito (ITS) em áreas de cabruca (CAB), floresta nativa (MN), pastagem (PAS), pré-SAF (SAF) e seringueira-cacau (SC).



5.3. Índice de diversidade

Analisando a diversidade de fungos (Figura 7), observa-se que para a análise *metabarcoding*, o índice de Shannon-Wiener (J') e Índice de Equitatividade de Pielou não tiveram diferenças significativas. No entanto, para a diversidade de bactérias (Figura 6), o índice de Shannon-Wiener (J') teve maiores valores para as áreas de seringueira-cacau e cabruca.

No sequenciamento *shotgun*, as áreas de seringueira-cacau e cabruca apresentaram os maiores valores, tanto para a diversidade de fungos, quanto para bactérias no índice de Shannon-Wiener (J'). Porém, a área de floresta nativa apresentou menor diversidade conforme o Índice de Equitatividade de Pielou para fungos e bactérias, podendo ser justificada por ser um sistema mais bem estabelecido.

Figura 6- Índices de Shannon-Wiener (H') e Equitatividade de Pielou (J) pelo *Metabarcoding* (A e B) e sequenciamento *Shotgun* (C e D) de amostras bacterianas.

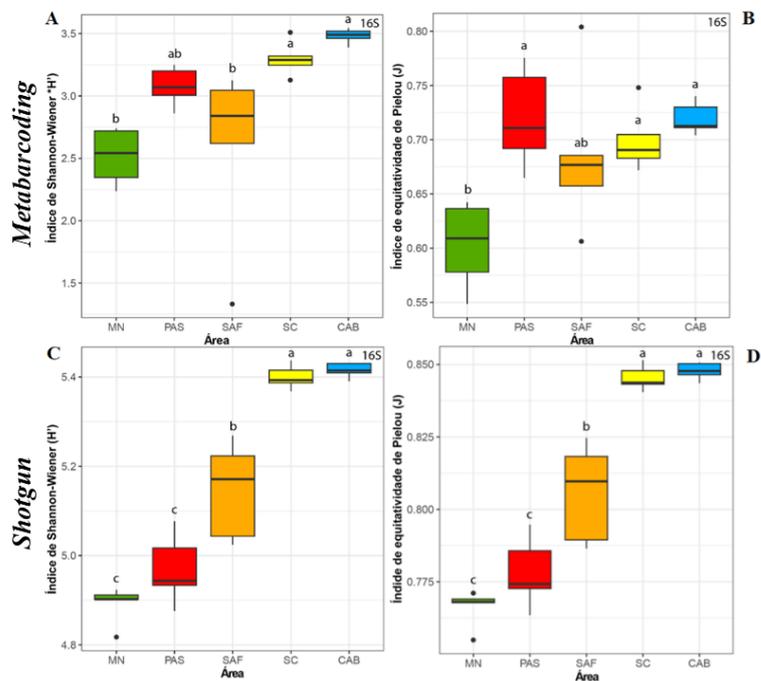
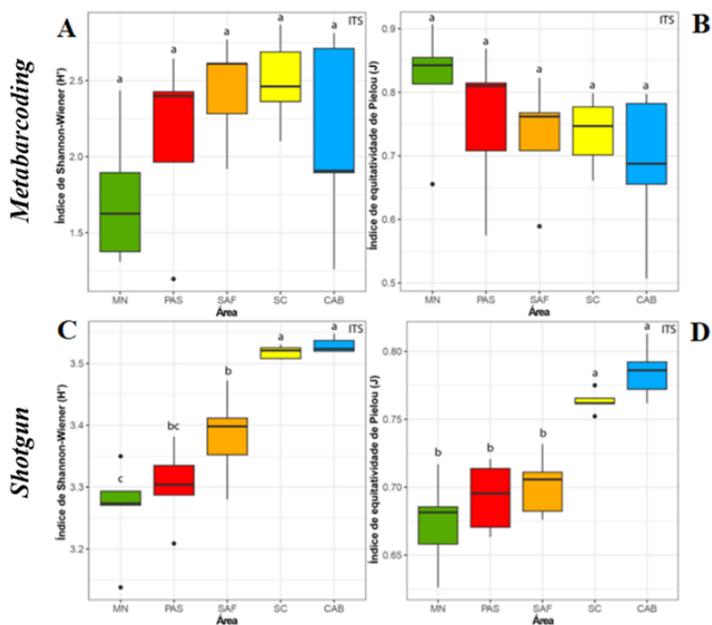


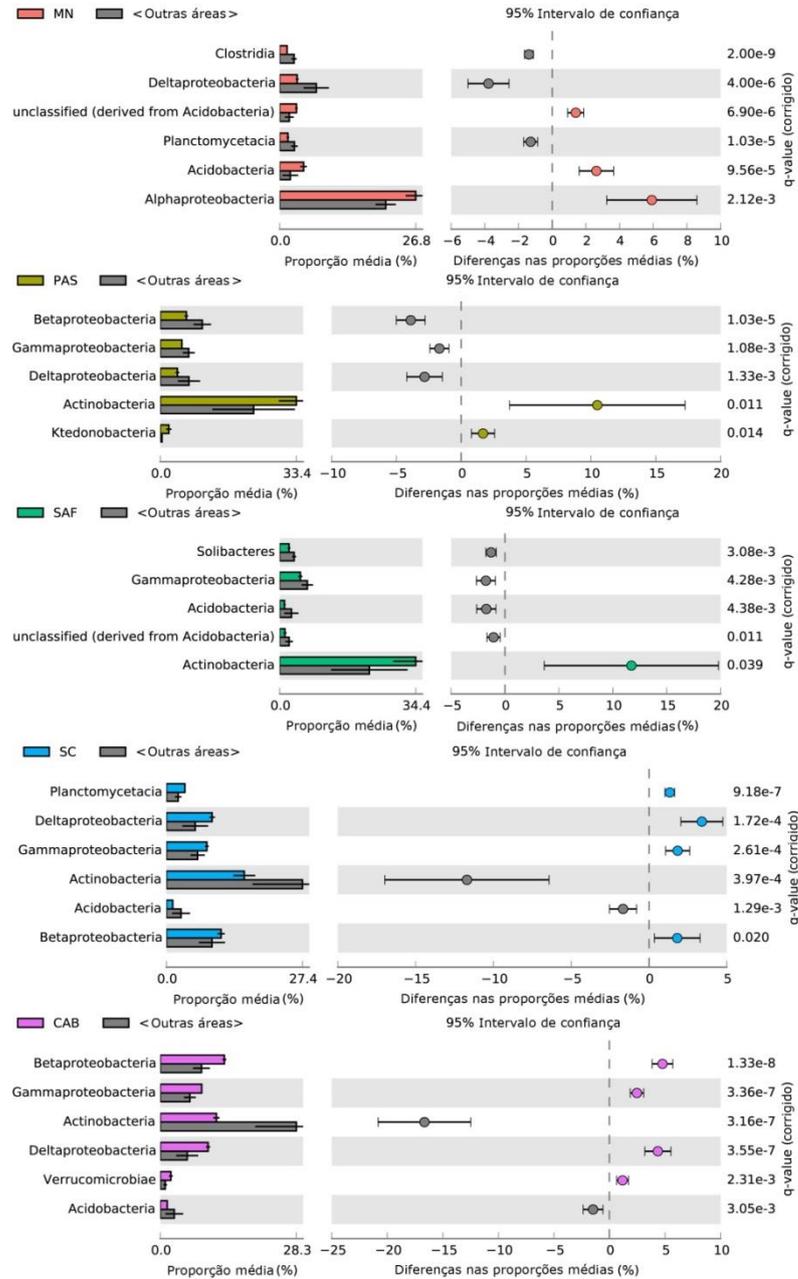
Figura 7- Índices de Shannon-Wiener (H') e Equitatividade de Pielou (J) pelo *Metabarcoding* (A e B) e sequenciamento de *Shotgun* (C e D) de amostras fúngicas.



5.4. Distribuição da diversidade microbiana nas áreas de estudo.

Para explorar a diversidade sobre a estrutura das comunidades bacterianas (Figura 8) e fúngicas (Figura 9) das áreas, foram feitas análises diferenciais em nível de classe.

Figura 8- Análise diferencial bacteriana entre as áreas (A) MN: floresta nativa; (B) PAS: pastagem; (C) SAF: pré-SAF; (D) SC: seringueira-cacau; e (E) CAB: cabruca, em nível de classe com correção FDR Benjamini-Hockberg ($q < 0,05$).



A análise de informações taxonômicas apontou maior diferença média de proporção de duas classes de bactérias para a área de floresta nativa (MN) (*Alphaproteobacteria* e *Acidobacteria*). Já pré-SAF (SAF) obteve maior expressividade de *Actinobacteria*. *Deltaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* e *Planctomycetacia* compuseram as classes mais dominantes em seringueira-cacau (SC), e em cabruca (CAB) as classes mais predominantes foram: *Deltaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* e *Verrucomicrobiae*, apresentando semelhança com seringueira-cacau. A área de pastagem (PAS) foi significativamente enriquecida com *Actinobacteria* e *Ktedonobacteria*.

Alphaproteobacterias possuem dominância em solos vegetados (BRUCE *et al.*, 2013), e manteve presente em solos de floresta nos estudos de Karimi *et al.*, (2018) ao qual, os autores relatam que esta classe tem participação importante no ciclo do nitrogênio, e são decompositoras de subprodutos da lignina. Os estudos de Fierer *et al.*, (2012) apontaram abundância desta classe com a adição de nitrogênio no solo. Populações de *Acidobacteria* são diretamente proporcionais a pH mais baixo (CONG *et al.*,2022), o que provavelmente se explica a presença deste filo nos solos de floresta nativa (Fig. 2).

As *Acidobacterias* habitam em ambientes que possuem elevado teor de C, possuindo papel significativo em seu metabolismo (LAUBER *et al.*, 2009; KALAM *et al.*, 2020). Ainda mais, são fundamentais na degradação da lignina, sendo um dos processos chaves na regulação do ciclo de C no solo (GAO *et al.*, 2019; XIA *et al.*,2015).

Destaca-se que *Alphaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* são classes inseridas dentro do filo *Proteobacterias*, aos quais são atuantes na fixação de nitrogênio, em sua grande parte participando de relações simbióticas com as plantas (ELE *et al.*,2022; OGOLA *et al.*,2021). Este filo possui forte associação com a disponibilidade e ciclagem de carbono, apresentando assim então, correlação positiva com a relação C/N (FIERER *et al.*, 2007; FAZI *et al.*, 2005; SPAIN *et al.*,2009; REN *et al.*,2020), sendo considerado abundante em solos com maior disponibilidade de carbono (HEGYI *et al.*, 2021).

Por outro lado, *Actinobacterias* possuem grande relevância na cooperação da ciclagem de nutrientes, dentre eles, carbono e nitrogênio (HILL *et al.*, 2011; BINGLIN *et al.*, 2019). E ainda, desempenham um importante papel na decomposição de resíduos vegetais, apresentando assim, potencial para o sequestro de carbono (BAO *et al.*,2021), o que também pode justificar sua presença na área de pré-SAF. Contudo, quando submetidas a estresses ambientais, as *Actinobacterias* entram em estado estável e quiescente pela sua capacidade de

formar esporos (TAKETANI *et al.*, 2016), se tornando assim, uma possível explicação para a presença desta classe na área de pastagem.

Ktedonobacteria é uma classe ramificada do filo *Chloroflexi*, o qual é bastante frequente em solos com baixa disponibilidade de carbono, e em áreas com maior incidência solar no ambiente como é o caso da pastagem (YU *et al.*, 2019; XU *et al.*, 2020; DAI *et al.*, 2019; WARD *et al.*, 2018).

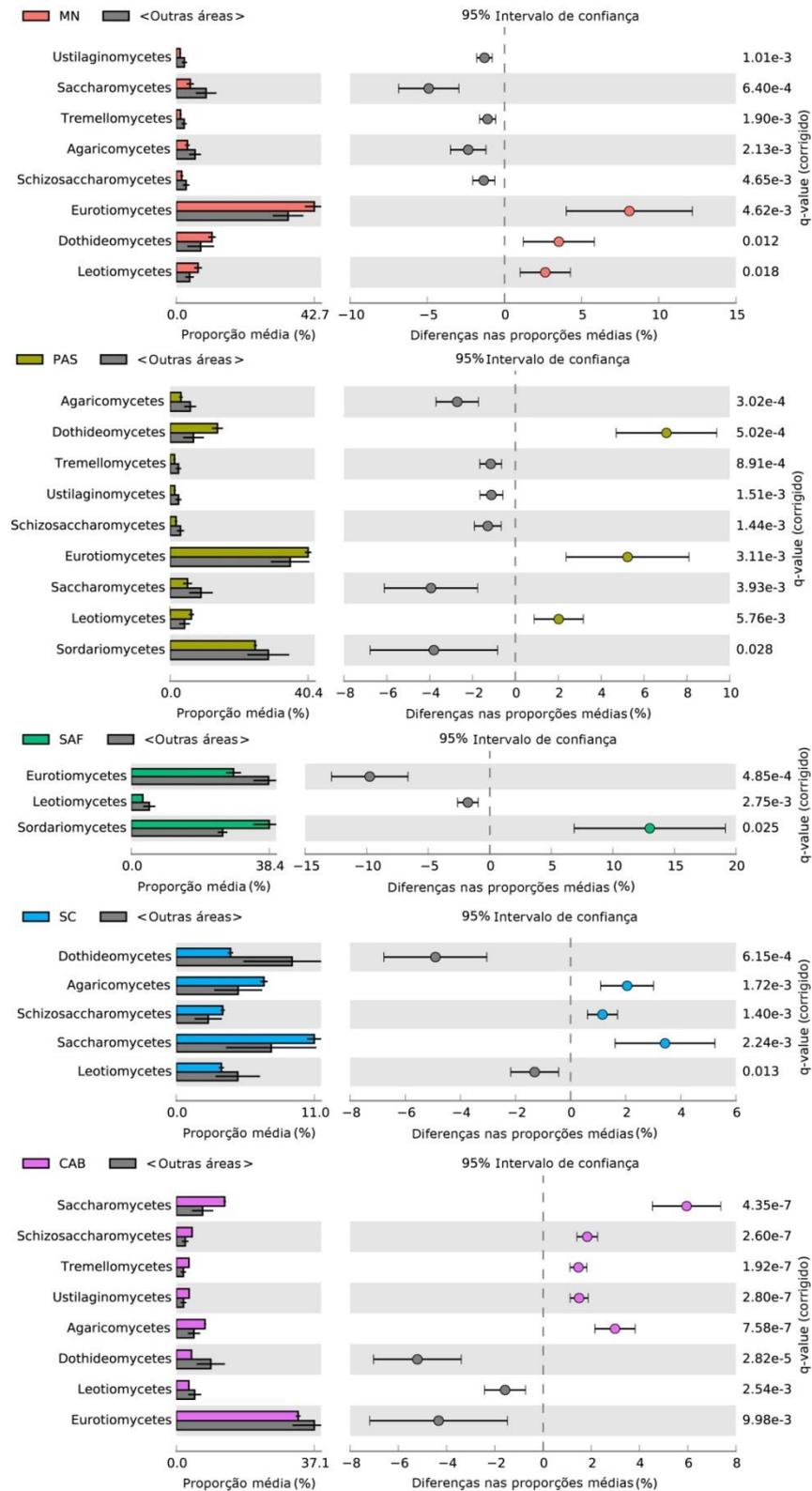
A análise diferencial fúngica (figura 9), demonstrou semelhança entre as áreas de seringueira-cacau e cabruca ao apresentar as classes fúngicas *Saccharomycetes*, *Agaricomycetes* e *Schizosaccharomycetes*. Contudo, além destes, cabruca expressou *Tremellomycetes* e *Ustilaginomycetes*. Mata nativa obteve maior diferença de proporção média para as classes de *Eurotiomycetes*, *Dothideomycetes* e *Leotiomycetes*, pertencentes ao filo *Ascomycota*. As mesmas classes também se expressaram para pastagem. A classe *Sordarlomycetes*, também pertencente ao filo *Ascomycota*, apresentou maior prevalência para a área de Pré-SAF.

No estudo de Cerqueira *et al.*, (2018) o filo *Ascomycota* apresentou dominância nas áreas de floresta e pastagem, assim como neste estudo. Isto pode ser atribuído ao fato de que fungos deste filo podem viver em diferentes ambientes (WEBSTER; WEBER, 2007).

Agaricomycetes atuam na decomposição da matéria orgânica e participação no ciclo do carbono (LEMEL *et al.*, 2021). Clemente *et al.*, (2006) relata que a diminuição de abundância relativa desta classe, pode provocar a interrupção do ciclo do carbono. Yu *et al.*, (2018) menciona que *Tremellomycetes* se correlacionou positivamente com o aumento da mineralização de carbono orgânico do solo.

No estudo de Wang *et al.*, (2023) sobre os efeitos da adubação verde em uma composição fúngica da rizosfera, os autores observaram o aumento da abundância de *Sordarlomycetes* com a implementação da adubação verde. Já Clocchiatti *et al.*, (2023), sugeriram que a celulose estimulou o crescimento desta classe fúngica. Estes fatores podem ser uma possível justificativa para a maior prevalência desta classe na área de pré-SAF, por se tratar de uma área enriquecida com adubação verde.

Figura 9- Análise diferencial fúngica entre as áreas (A) PAS: pastagem; (B) SAF: pré-SAF; (C) SC: seringueira-cacau; e (D) CAB: cabruca, em nível de classe com correção FDR Benjamini-Hockberg. Para MN: floresta nativa não houve diferença significativa após FDR.



A análise de diversidade microbiana baseada em peptídeos (Figura 10 e 11) revelou alta diversidade nas áreas de seringueira-cacau e mata nativa com táxons que fazem parte da fixação e transformação do carbono, como *Actinobacteria* e *Proteobacteria*, obtendo assim, melhor saúde do solo.

Entre as sequências de *Proteobacterias* nas duas áreas, constata-se a presença de classes como: *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria*. Já, dentro do filo de *Actinobacteria* tanto em seringueira-cacau quanto na mata nativa detecta-se a existência das classes *Acidimicrobia* e *Actinomycetia*, demonstrando a semelhança entre as áreas.

Figura 10- Abundância de peptídeos distribuída entre os diferentes táxons nas áreas de seringueira-cacau (SC). As árvores filogenéticas foram construídas baseadas na lista de peptídeos identificados utilizando o método Menor Ancestral Comum (LCA). Com destaque para o domínio Bactéria e para os filos *Proteobacteria* e *Actinobacteria*.

SC

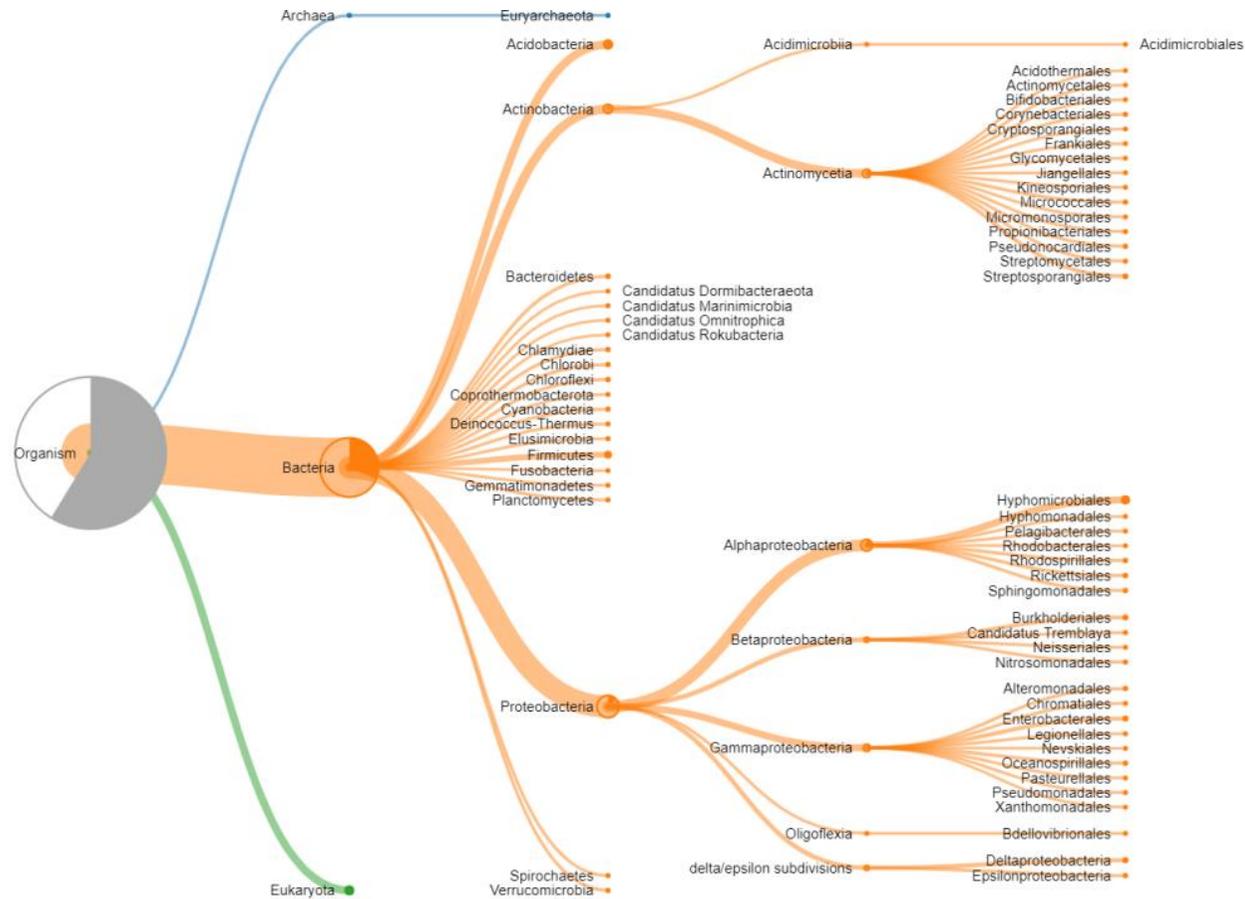
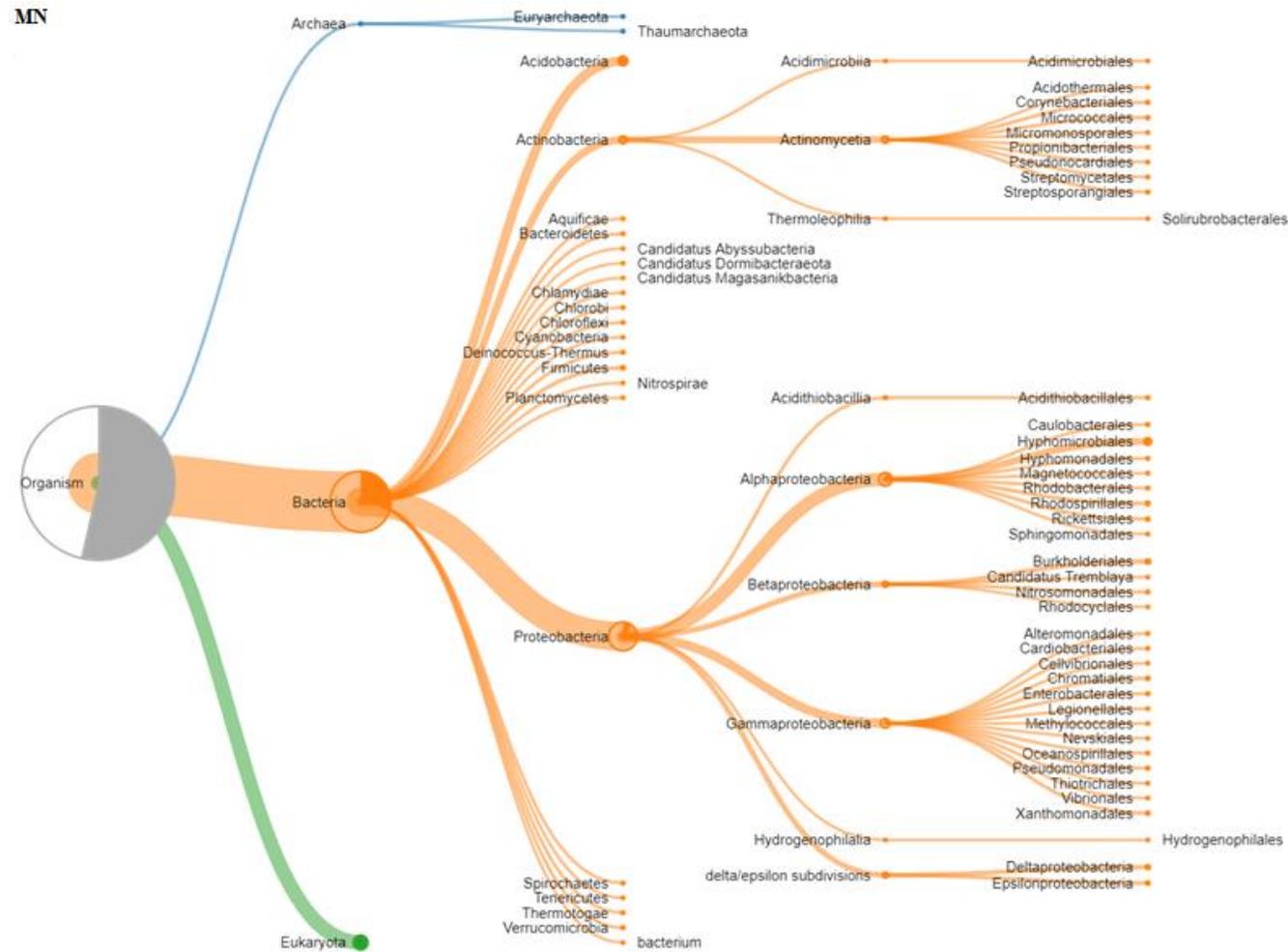


Figura 11- Abundância de peptídeos distribuída entre os diferentes táxons nas áreas de floresta nativa (MN). As árvores filogenéticas foram construídas baseadas na lista de peptídeos identificados utilizando o método Menor Ancestral Comum (LCA). Com destaque para o domínio Bactéria e para os filos *Proteobacteria* e *Actinobacteria*.



Rocha *et al.*,(2021) relatam que *Alphaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria* ajudam a mitigar as emissões de metano por possuírem características metanotróficas, sendo intimamente importantes para a ciclagem de C. *Betaproteobacterias* são detectadas em ambientes que possuem diversidade metabólica como nitrificação e biodegradação de compostos (CHAKRABORTY *et al.*, 2020; LU *et al.*, 2014). Já *Actinomycetia* possui um importante papel no solo, pois realizam associações com plantas não leguminosas, promovendo a fixação do nitrogênio no solo, também atuando na reciclagem de matéria orgânica, através da produção de enzimas hidrolíticas (BHATTI *et al.*, 2017).

Actinobacterias detém de um arsenal altamente diversificado de enzimas mineralizadoras da matéria orgânica do solo (TRIVEDI *et al.*, 2013), com ocorrência de espécies que fazem a fixação de dióxido de carbono. Além de serem mais abundantes onde a relação C/N é mais alta (JIAO *et al.*, 2018; DE MENEZES *et al.*, 2015). *Proteobacterias* possuem representantes que respondem positivamente ao aumento do teor de matéria orgânica no solo (FIERER *et al.*, 2007) e diversas espécies que realizam a fixação de nitrogênio atmosférico.

Cabe destacar que diferentemente de seringueira-cacau, mata nativa apresentou o gênero *Solirubrobacter* dentro de *Actinobacteria*. Além de também manifestar o filo *Nitrospirae* que possui relação com o ciclo do nitrogênio. Lee *et al.*, (2021) afirmam de identificar marcadores de organismos do solo, afirmam que a presença de *Nitrospirae* é um potencial indicador da qualidade do solo. Já *Solirubrobacter* tem ocorrência em solos estáveis, como relatam Liao *et al.*, (2019), os quais relacionaram este gênero a melhoria de condições de solo em agroecossistemas sustentáveis.

5.5. Análise de rede

A análise de rede possibilita o conhecimento sobre importantes associações entre espécies em função do ecossistema (KHAN *et al.*, 2019). Com isso, neste estudo, esta análise foi usada para investigar as interações de espécies em função do ciclo do carbono e nitrogênio das áreas.

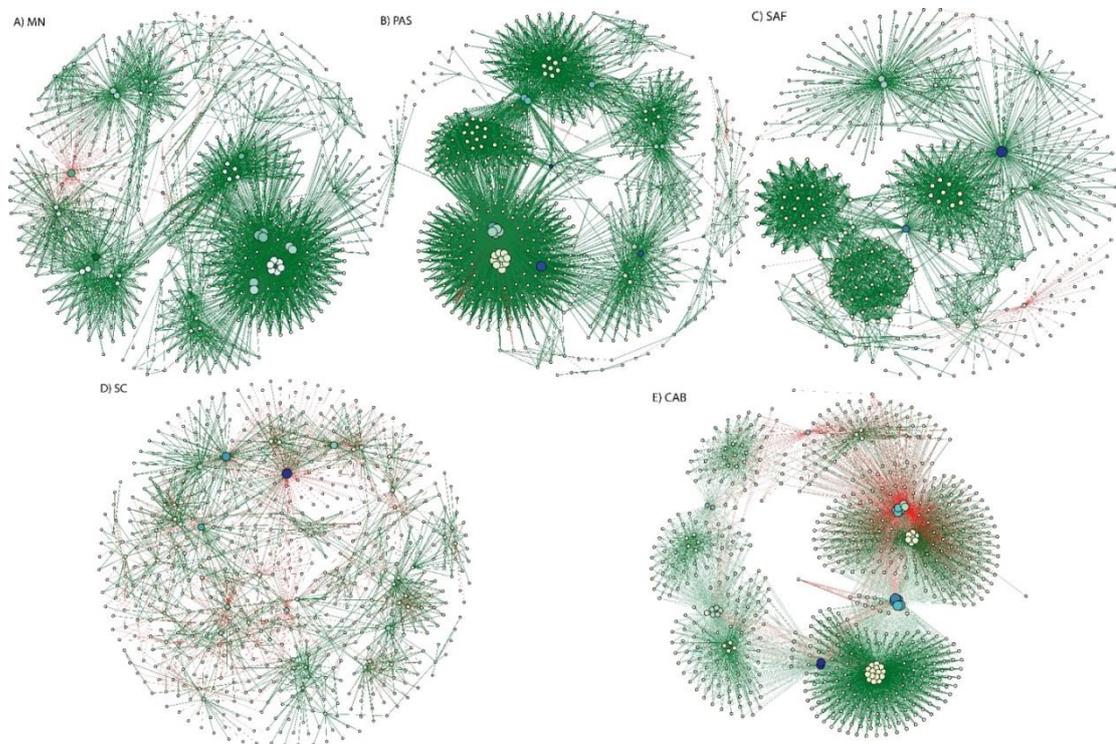
Na tabela 3, observa-se elevado número de espécies e funções do ciclo do carbono e nitrogênio (nós), principalmente para as áreas de SAF's maduros (CAB e SC), com destaque para o CAB com maior quantidade de conexões (arestas) e fortes relações que aumenta a conectividade entre os nós (diâmetro da análise de rede e distância média dos nós). Isto se traduz em um sistema mais denso e difícil de sofrer impactos.

Tabela 3- Propriedades das análises de rede dos microbiomas das áreas estudadas.

	MN	PAS	SAF	SC	CAB
Nº de Nós	559	594	470	642	652
Nº de arestas	3527	5692	2518	2143	9989
Diâmetro da análise de rede	11	12	12	10	7
Distância média dos nós	4,20	3,65	4,33	4,82	2,78
Média de conexões	12,62	19,17	10,72	6,68	30,64

Visto que quanto maior a densidade dos agrupamentos e maior quantidade de agrupamentos, mais resiliente as comunidades se tornam (Figura 12), mesmo tendo relações negativas entre essas comunidades.

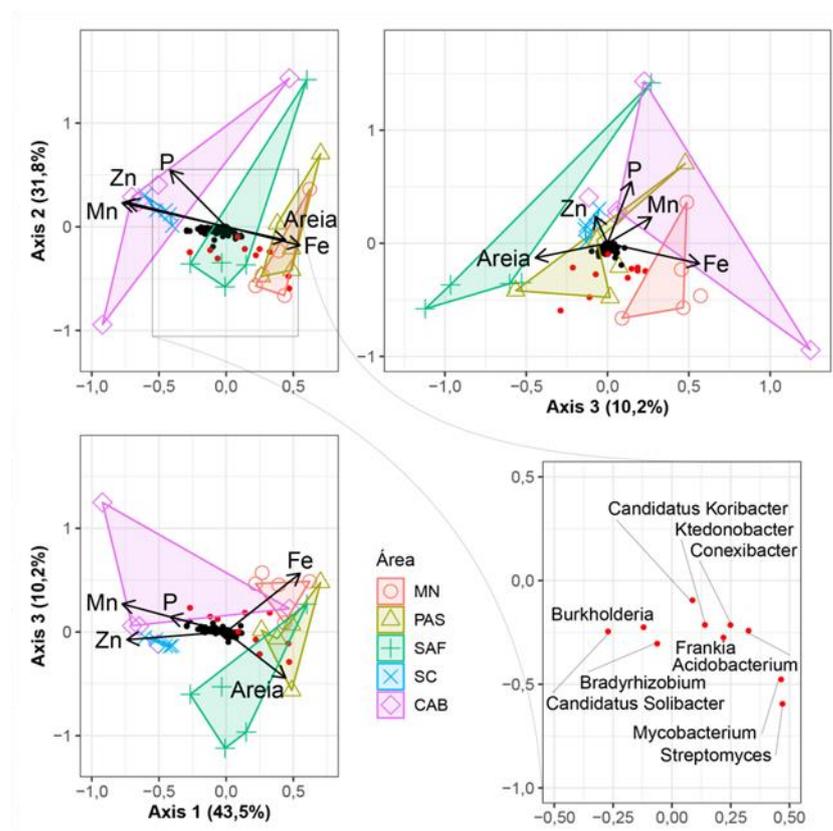
Figura 12-Análise de rede dos microbiomas das áreas estudadas. Linhas em verde são relações positivas entre as espécies e funções, linhas vermelhas são relações negativas.



5.6. Relação entre comunidades microbianas e propriedades ambientais.

A análise de redundância (RDA) foi utilizada para evidenciar as principais relações existentes entre os atributos do solo e a abundância relativa dos metagenômas, em nível de gêneros microbianos, nos distintos manejos agroflorestais. Aproximadamente 75 % da variabilidade dos resultados de abundância relativa dos metagenômas pode ser associada aos atributos de solo. Os três primeiros eixos da RDA foram responsáveis por explicar 85,5% da variação total na composição (Figura 13). Dos atributos de solo examinados, somente areia, manganês, ferro, fósforo e zinco foram considerados significativos.

Figura 13- Análise de redundância (RDA) para abundância relativa dos metagenômas (nível de gêneros microbianos com distância de Bray-curtis) nos distintos manejos agroflorestais, considerando os atributos do solo. MN – Floresta nativa; PAS – Pastagem; SAF – Sistema pré-SAF; SC - Consórcio seringueira-cacau; CAB- Sistema de cultivo Cabruca.



Observou-se que os atributos do solo Mn, Zn e P foram diretamente associados às áreas de seringueira-cacau e cabruca e inversamente as áreas de mata nativa e pastagem. Tendência oposta anteriormente mencionada foi observada para os atributos Fe e areia.

Os gêneros de bactérias dos filios *Acidobacteria* (*Candidatus Solibacter* e *Candidatus Koribacter*), *Proteobacteria* (*Bradyrhizobium* e *Burkholderia*) e *Chloroflexi* (*Ktedonobacter*) foram associados principalmente aos solos dos SAF, enquanto que os filios *Actinobacteria* (*Streptomyces*, *Mycobacterium*, *Frankia*, *Conexibacter*) e *Acidobacteria* (*Acidobacterium*) associado às áreas de mata nativa e pastagem.

O estudo de Romano-Armada *et al.*, (2020) revela que o gênero *Streptomyces* possui mecanismo que possibilitam sua adaptação em ambientes de estresse, tornando-os grandes competidores. Além disso, de forma geral, as bactérias do filo *Actinobacteria* são conhecidas por possuírem tolerância a ambientes em condições severas, com alta radiação, baixos níveis de umidade e nutrientes, o que justifica a sua presença em área de pastagem com elevado grau de degradação (WALSH *et al.*, 2019; SHIVLATA *et al.*, 2015). A associação desses grupos as áreas de floresta nativa, poderia estar relacionada aos baixos níveis de nutrientes. Assim como nos solos de pastagem, as amostras coletadas sobre floresta apresentaram os menores níveis de saturação por bases e os maiores níveis de saturação por alumínio, além de baixos níveis de P, Mn e Zn.

Considerando as *Ktedonobacterias*, estas possuem condições metabólicas capazes de promover a adaptabilidade a condições de ambientes que vão desde a habitats com condições extremas a rica em nutrientes (YABE *et al.*, 2017). Também se presume que na área de Pré-SAF, a adubação verde tenha favorecido a ocorrência de bactérias do gênero *Frankia*, tendo em vista que são fixadoras de nitrogênio (DIAGNE *et al.*, 2013; ARONSO; BOYER, 1994).

Kour *et al.*, (2021) ao realizar uma revisão sobre os microrganismos solubilizadores e mobilizadores de fósforo identificaram 551 solubilizadores de P, e dentre estes o filo mais dominante era *Proteobacteria* com 38%. E ainda, Ghosh *et al.*, (2018) ao pesquisarem a percepção metagenômica sobre a diversidade de microrganismos em áreas que continham manganês, comprovaram que os filios *Proteobacteria* e *Acidobacteria* foram os mais abundantes. Os mesmos autores afirmam que estes filios possuem atividade solubilizadora de Mn (GHOSH *et al.*, 2015), tornando este micronutriente disponível para as plantas.

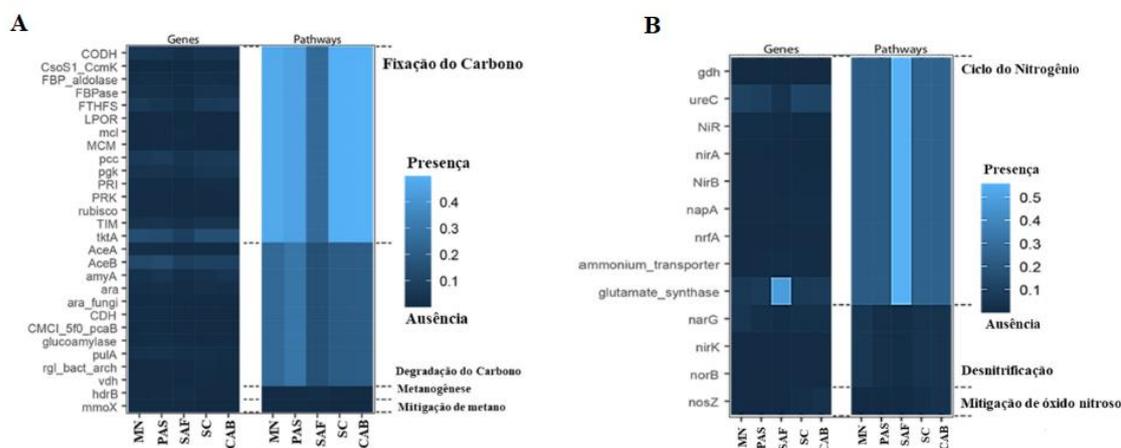
5.7. Genes e vias metabólicas relacionadas à ciclagem de carbono e nitrogênio observados nos diferentes manejos.

O metagenôma revelou alta abundância de genes chaves na ciclagem de nitrogênio, como *UreC* (amonificação), sendo expresso nas áreas floresta, pastagem, cabruca e seringueira-cacau (Figura 14-A). Em relação às pathways, os genes envolvidos nos processos de desnitrificação (*narG*, *nirK*, *norB* e *nosZ*), principal mecanismo de remoção de nitrogênio e transformação em gases não apresentam representatividade nas áreas de estudo, tendo em vista que se trata de genes contribuem substancialmente para o aquecimento global (BACHAND *et al.*, 1999).

Na figura 14-B é possível observar a abundância de genes envolvidos na fixação do carbono, principalmente *tktA* nas áreas de floresta, seringueira-cacau e abruca, seguidos por *pcc*, *FTHFS*. Ao avaliarmos as pathways, é importante destacar maior representatividade de participantes do ciclo do carbono nas áreas de seringueira-cacau, cabruca e floresta.

Ressalta-se que a fixação de carbono foi mais aprimorada em áreas de SAF's maduros (SC e CAB). Em contrapartida, o ciclo do nitrogênio obteve maior destaque em pré-SAF, onde houve a recente introdução de leguminosas como adubo verde. Além disso, em pastagem observam-se genes relacionados à degradação do carbono, indicando estresse, visto que se trata de uma pastagem em elevado grau de degradação. Com isso, as comunidades microbianas se proliferam e utilizam a energia gerada para lidar com o estresse ambiental.

Figura 14-Heatmap mostrando a abundância dos genes funcionais e vias metabólicas ligadas às transformações do Carbono (A) e Nitrogênio (B) nos solos estudados. MN: floresta nativa, PAS: pastagem, SAF: pré-SAF; SC: seringueira-cacau e CAB: cabruca.



As vias de ciclagem de nitrogênio são aprimoradas em pré-SAF, o que pode ter relação com o uso recente de adubação verde com leguminosas, sendo assim então, condizente com os estudos de Hu *et al.*, (2021), os quais inferiram que leguminosas podem proporcionar a estimulação de microrganismos que participam da ciclagem de N.

De todos os genes encontrados nas áreas avaliadas, *glutamate synthase* foi o que apresentou abundância na área de pré-SAF. Estudos discorrem que *glutamate synthase* está envolvida na assimilação de nitrogênio inorgânico e balanço carbono-nitrogênio (KONISHI *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2016). O gene *UreC* é codificador da urease, onde no solo, sua produção é oriunda principalmente de microrganismos, sendo assim então, uma importante enzima para o ciclo do N no solo, a qual gera N disponível para as plantas (WANG *et al.*, 2022; SINSABAUGH *et al.*, 2000). Os genes que participam da redução dissimilatória de nitrogênio a amônio e redução assimilatória de N (*napA*, *nrfA*, *nirA* e *nirB*) também encontram-se presentes nas áreas de estudo (GAO *et al.*, 2021).

tktA é um gene codificador de transcetolase, enzima chave envolvida no ciclo de ciclo de Calvin-Benson-Bassham, considerada a via mais importante de fixação do carbono entre os processos de metabolismo microbiano (HU *et al.*, 2011; TABITA *et al.*, 2007). *FTHFS* codifica a enzima formiltetrahidrofolato sintetase, que participa da via Wood-Ljungdahl, também considerada via de fixação de carbono (SINGH *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2016; BERG, 2011). Os genes *pcc*, *mcl*, *mcm* também participam da via metabólicas da carboxilação de acetil-CoA e propionil-CoA por acetil-CoA/propionil-CoA carboxilase, todas essas são reações de fixação de CO₂ na biomassa microbiana (HÜGLER; FULCHS, 2005).

As áreas de pré-SAF e pastagem apresentaram similaridade em relação aos genes de fixação e degradação do carbono. Contudo, é válido destacar que pré-SAF ainda é uma área em implantação, com isso, as comunidades microbianas estão começando seus processos de sucessão ecológica, podendo provocar competição por nichos disponíveis.

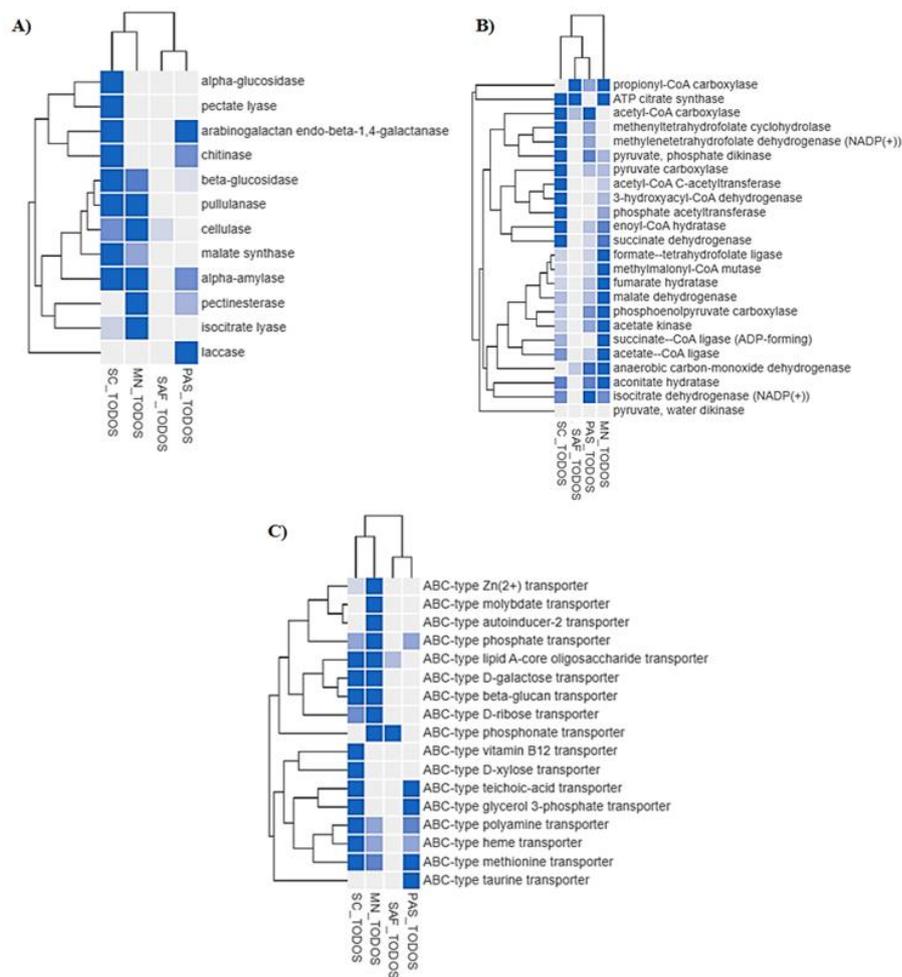
Em contrapartida, seringueira-cacau e cabruca obtiveram maior abundância de genes voltados para a fixação do carbono, mostrando que o manejo nessas áreas foi eficaz na melhoria das condições ambientais, com importante participação da microbiota para a saúde do solo e mitigação da emissão de CO₂.

5.8. Abundância de enzimas

A análise metaproteômica (Figura 15) apontou a similaridade de enzimas envolvidas na mineralização da matéria orgânica nas áreas de seringueira-cacau e mata nativa, o que se justifica pela maior presença de matéria orgânica, de acordo com a análise de atributos do

solo (Figura 2) possibilitando assim, maior atividade microbiana na transformação da matéria orgânica e liberação de componentes orgânicos absorvidos por microrganismos.

Figura 15-Abundância de enzimas entre as áreas SC (seringueira-cacau), MN (floresta nativa), SAF (pré-SAF) e PAS (pastagem). Figura A- Enzimas responsáveis pela mineralização da matéria orgânica do solo, Figura B- Enzimas responsáveis pela fixação de carbono e Figura C - Transportadores ABC encontrados no estudo. Quanto maior a intensidade do azul, maior a abundância.



Constatou-se a presença de 24 enzimas envolvidas na fixação do carbono, sendo a grande maioria nas áreas de seringueira-cacau e mata nativa. Cabe destacar que pastagem e pré-SAF foram às áreas que apresentaram baixa quantidade de enzimas fixadoras de carbono. Esses resultados estão de acordo com as análises metagenômicas, mostrando a importância da participação das comunidades microbianas ao fixarem carbono, e assim, mitigarem os efeitos de dióxido de carbono na atmosfera.

Na figura 15-B, também nota-se a presença de 6 enzimas de atividades desidrogenases, uma enzima chave na determinação da vida do fluxo de carbono, sendo importante indicadora de atividade microbiana no solo por serem ativas apenas em células vivas (MIERZWA-HERSZTEK *et al.*, 2020 ;BEHESHTI *et al.*, 2018).

Foi possível verificar maior abundância e similaridade de transportadores ABC entre seringueira-cacau e mata nativa do que nas demais áreas. Os transportadores ABC estão envolvidos em vários processos biológicos, capazes de transportar diversos substratos através das membranas celulares por hidrólise de adenosina trifosfato (ATP) (SAHA *et al.*, 2015). No solo, algumas bactérias possuem relevante número desses transportadores, que são benéficos às comunidades bacterianas, sendo importantes na absorção de nutrientes e também na proteção contra estresses ambientais (GUILIANI *et al.*, 2011; KIM *et al.*,2021).

São enzimas fundamentais na absorção de aminoácidos, di/oligo peptídeos, ribose, mono e oligossacarídeos e outros componentes orgânicos (GUILIANI *et al.*, 2011; MALIK *et al.*, 2018).

6. CONCLUSÕES

Os sistemas agroflorestais cabruca e seringueira-cacau apresentaram maior diversidade de fungos e bactérias que desempenham importante papel para o funcionamento do ambiente. Além de constatarem a abundância de genes e proteínas relacionadas à fixação do carbono quando comparados à pastagem, por conseguinte, refletindo a saúde do solo.

No sistema agroflorestal em implantação, observou-se que o uso da adubação verde incrementou a abundância de microrganismos que contribuem para a ciclagem do nitrogênio, justificando a contribuição do manejo para a qualidade biológica do solo nos estágios iniciais do plantio. Porém as enzimas do ciclo do C eram mais abundantes em SAFs mais maduros (cabruca e seringueira-cacau).

A metagenômica e a metaproteômica se demonstram ferramentas valiosas na descrição dos efeitos do manejo sobre a comunidade microbiana, revelando que uma maior saúde do solo pode proporcionar maior fixação de carbono e nitrogênio, mitigando os danos causados por gases do efeito estufa, e fornecendo o diagnóstico sobre o estado funcional do solo. Valores derivados destas análises devem compor um índice de saúde que incorpore métricas de diversidade microbiana e do status bioquímico do solo.

7. REFERÊNCIAS

- ACINAS, S. G. et al. Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple rrn operons. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 9, p. 2629-2635, 2004.
- AGUIAR-PULIDO, V.; HUANG, W.; SUAREZ-ULLOA, V.; CICKOVSKI, T.; MATHEE, K.; NARASIMHAN, G. (2016). Metagenomics, metatranscriptomics and metabolomics approaches for microbiome analysis. **Evolution Bioinforma.** 12, 5–16. doi: 10.4137/EBO.S36436
- AHMED, Y. A-R.; PICHLER, V.; HOMOLÁK, M.; GÖMÖRYOVÁ, E.; NAGY, D.; PICHLEROVÁ, M.; GREGOR, J. (2012): The high stock of organic carbon in a karst soil of the Central European forest province persists after centuries of agroforestry management. **European Journal of Forestry Research**, 13: 1669-1680.
- ALLEN, D. N.; GOLDSTEIN, G (2013). Cluster Analysis in Neuropsychological Research: Recent Applications. New York, NY: **Springer Science & Business Media**.
- ALEXANDER, C. E.; CRESSE, M. S. An assessment of the possible impact of expansion of native woodland cover on the chemistry of Scottish freshwaters. **Forest Ecology and Management**, v.73, n.1, p.1-27, 1995.
- ALEIXO, S.; GAMA-RODRIGUES, A. C.; GAMA-RODRIGUES, E. F.; SCHRIPEMA, J. Organic phosphorus of soils under cacao agroforests in the Atlantic coast of Brazil, **Geoderma Regional**, v. 17, 2019, e. 00220, ISSN 2352-0094, <https://doi.org/10.1016/j.geodrs.2019.e00220>.
- ALTIERI, M. A. The ecological role of biodiversity in agroecosystems Agric. **Ecosyst Environ**, 74 (1999), pp. 19-31.
- ALVARES, C.A.; STAPE, J.L.; SENTELHAS, P.C.; GONÇALVES, J.L.M.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v.22, n.6, p.711-728, 2013.
- ALVAREZ, A.; SAEZ, J. M.; COSTA, J. S. D.; COLIN, V. L.; FUENTES, M. S.; CUOZZO, S. A. et al. (2017). Actinobacteria: Current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals. **Chemosphere**, v. 166, p. 41-62. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.070>
- ALVES, L. F.; WESTMANN, C. A.; LOVATE, G. L.; SIQUEIRA, G. M. V.; BORELLI, T. C.; GUAZZARONI, M." Metagenomic Approaches for Understanding New Concepts in Microbial Science ", **International Journal of Genomics** , vol. 2018 , Artigo ID 2312987 , 15 páginas , 2018 . <https://doi.org/10.1155/2018/2312987>
- AMPONSAH-DOKU, B.; DAYMOND, A.; ROBINSON, S.; ATUAH, L.; SIZMUR, T. Improving soil health and closing the yield gap of cocoa production in Ghana – A review, **Scientific African**, v.15, 2022, e01075, ISSN 2468-2276, <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2021.e01075>.

ARONSON, D. B.; BOYER, G. L. Growth and siderophore formation in six iron-limited strains of *Frankia*. **Soil biology and biochemistry**, v. 26, n. 5, p. 561-567, 1994.

BACHAND P. A. M.; HORNE, A. J. Denitrification in constructed free-water surface wetlands: II. Effects of vegetation and temperature. **Ecol Eng.** 1999;14:17–32.

BALOTA, E. L. **Manejo e qualidade biológica do solo**. Londrina: Editora Mecenas, 2017. p. 288.

BAO, Y.; DOLFING, J.; GUO, Z. et al. Important ecophysiological roles of non-dominant Actinobacteria in plant residue decomposition, especially in less fertile soils. **Microbiome** 9, 84 (2021). <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01032-x>

BAGNALL, D. K.; SHANAHAN, J. F.; FLANDERS, A.; MORGAN, C. L. S.; HONEYCUTT, C. W. Soil health considerations for global food security. **Agronomy Journal**. 2021;113:4581–4589. <https://doi.org/10.1002/agj2.20783>.

BARRIOS, E. (2007). Soil biota, ecosystem services and land productivity. **Ecol Econ** 64: 269–285.

BARBOSA, T. C. S. et al. Qualidade física do solo em áreas sob manejo agroecológico e convencional / Physical soil quality in area under agroecological and conventional management. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 48899–48909, 2020.

BASTIDA, F.; MORENO, J.L.; NICOLÁS, C.; HERNANDEZ, T.; GARCIA, C. Soil metaproteomics: A review of an emerging environmental science. Significance, methodology and perspectives. *Eur. J. Soil Sci.* 2009, 60, 845–859.

BATISTA, E. R. et al. Atributos biológicos do solo em sistema integrado de produção agropecuária. In: SOUZA, E. D. de et al (Org.). *Sistemas Integrados de produção agropecuária no Brasil*. **Tubarão: Copiart**, 2018. v. 1, p. 71-90

BAVOSO, M. A. et al. Preparo do solo em áreas de produção de grãos, silagem e pastejo: efeito na resistência tênsil e friabilidade de agregados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 227-234, 2010.

BEHESHTI, M.; ETESAMI, H.; ALIKHANI, H.A. Effect of different biochars amendment on soil biological indicators in a calcareous soil. **Environ Sci Pollut Res** 25, 14752–14761 (2018). <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1682-2>.

BENNDORF, D.; BALCKE, G. U.; HARMS, H.; BERGEN, M. Functional metaproteome analysis of protein extracts from contaminated soil and groundwater. **ISME J.** 2007;1:224–234. doi: 10.1038/ismej.2007.39.

BERG, I. A. 2011. Ecological aspects of the distribution of different autotrophic CO₂ fixation pathways. **Appl Environ Microbiol.** 77:1925–1936. doi: 10.1128/AEM.02473-10.

BERNARDES, C. M.; SANTOS, M. A. População microbiana como indicadora de interferência de diferentes manejos de solos de Cerrado com cultivo de soja. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 22, n. 2, p. 7-16, 2006.

BHADURI, D.; SIHI, D.; BHOWMIK, A.; VERMA, B. C.; MUNDA, S; DARI, B (2022) A review on effective soil health bio-indicators for ecosystem restoration and sustainability. **Front. Microbiol.** 13:938481. doi: 10.3389/fmicb.2022.93848

BHAT, A. K (2013) Preserving soil ecosystem microbial diversity: a key to sustainable productivity. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, 2, 85-101.

BHATTI, A. A.; HAQ, S.; BHAT, R. A. Actinomycetes benefaction role in soil and plant health, **Microbial Pathogenesis**, V. 111, 2017, Pg. 458-467, ISSN 0882-4010, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.09.036>.

BINGLIN, Z.; XIUKUN, W.; XISHENG, T.; LIKUN, S.;MINGHUI, W.; WEI, Z.; XIMING,C ; GAOSEN, Z; TUO, C.; GUANGXIU, L.; PAUL, D. Variation in Actinobacterial Community Composition and Potential Function in Different Soil Ecosystems Belonging to the Arid Heihe River Basin of Northwest China. **Frontiers in Microbiology**, V.10, 2019. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.02209>

BLAKELEY-RUIZ, J. A.; MCCLINTOCK, C. S.; LYDIC, R.; BAGHDOYAN, H.A.; CHOO, J.J.; HETTICH, R.L. **Combining integrated systems-biology approaches with intervention-based experimental design provides a higher-resolution path forward for microbiome research** *Behav Brain Sci*, 42 (2019), Article e66, 10.1017/S0140525X18002911.

BONFANTE, P.; VENICE, F. Mucoromycota: going to the roots of plant-interacting fungi. *Fungal Biology Reviews*, v. 34, n. 2, p. 100-113, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2019.12.003>

BOUCHEZ, T.; BLIEUX, A. L.; DEQUIEDT, S.; DOMAIZON, I.; DUFRESNE, A.; FERREIRA, S.; GODON, J. J.; HELLAL, J.; JOULIAN, C.; QUAISER, A.; Molecular microbiology methods for environmental diagnosis. **Environment. Chemistry Lett.** 2016 , 14 , 423-441.

BUSCOT, F. **What are soils? Microorganisms in soils: roles in genesis and functions.** Heidelberg: Springer Verlag, 2005, p. 3-18.

CANHOS, V.P. et al. **Diversidade no domínio bactéria.** In: CANHOS, V.P. et al. Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX. São Paulo: FAPESP, 1997. p.1-13.

CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; JUNIOR, M. D.; BOARETTO, R. M.; RAIJ, B. Van; (Ed.) **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo.** 2.ed. Campinas: IAC, 2022. 285p. (Boletim Técnico, 100).

CARNEIRO, M. A. C. et al. Atributos físicos, químicos e biológicos de solo de cerrado sob diferentes sistemas de uso e manejo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p.147-157, 2009.

CERQUEIRA, A.E.S.; SILVA, T.H.; NUNES, A.C.S.; NUNES, D.D.; LOBATO, L.C.; VELOSO, T.G.R.; DE PAULA, S.O.; KASUYA, M.C.M.; SILVA, C.C. (2018). Amazon basin pasture soils reveal susceptibility to phytopathogens and lower fungal community dissimilarity than forest. **Applied Soil Ecology**, (), S0929139318302312–. doi:10.1016/j.apsoil.2018.07.004.

CHAKRABORTY, A.; DASGUPTA, C. K.; BHADURY, P. Diversity of Betaproteobacteria revealed by novel primers suggests their role in arsenic cycling, *Heliyon*, V. 6, Issue 1, 2020, e03089, ISSN 2405-8440, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03089>.

CHEN, W. et al. 2018. Consistent responses of surface- and subsurface soil fungal diversity to N enrichment are mediated differently by acidification and plant community in a semi-arid grassland. **Soil Biology and Biochemistry**.

CHEN, Q.; DING, J.; ZHU, Y.; HE, J.; HU, H. Soil bacterial taxonomic diversity is critical to maintaining the plant productivity, **Environment International**, v. 140, 2020, 105766, ISSN 0160-4120, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105766>.

CHEN, Q.; NIU, B.; HU, Y.; LUO, T.; ANDZHANG, G. (2020). Warming and increased precipitation indirectly affect the composition and turnover of labile-fraction soil organic matter by directly affecting vegetation and microorganisms. **Sci. Total Environ.** 714:136787. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.136787.

CHU, B. T.; PETROVICH, M. L.; CHAUDHARY, A.; WRIGHT, D.; MURPHY, B.; WELLS, G.; PORETSKY, R. (2018) Metagenomics reveals the impact of wastewater treatment plants on the dispersal of microorganisms and genes in aquatic sediments. **Applied and Environmental Microbiology** 84(5): e02168-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02168-17>

CLAGNAN, E.; ROLFE, S. A.; THORNTON, S. F.; KROL, D.; RICHARDS, K. G.; LANIGAN, G.; TUOHY, P.; FENTON, O. Nitrogen transformation processes and gaseous emissions from a humic gley soil at two water filled pore spaces, **Soil and Tillage Research**, v. 198, 2020, 104543, ISSN 0167-1987, <https://doi.org/10.1016/j.still.2019.104543>.

CLOCCHIATTI, A.; HANNULA, E. S.; HUNDSCHIED, M. P. J.; GUNNEWIEK, P. J. A. K.; DE BOER, W. Utilizing woody materials for fungal-based management of soil nitrogen pools, **Applied Soil Ecology**, v. 181, 2023, 104663, ISSN 0929-1393, <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2022.104663>.

COLE, J. R.; WANG, J. A.; FISH, B.; CHAI, D. M.; MCGARRELL, Y.; BROWN, C. T.; PORRAS-ALFARO, A.; KUSKE, C. R.; TIEDJE, J. M. 2014. **Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis Nucl. Acids Res.** 42(Database issue):D633-D642; doi: 10.1093/nar/gkt1244.

CONG, W.; YU, J.J.; YU, H.M.; DING, Y.; ZHANG, Y.G. Diversity and community assembly of forest soil microorganisms in different climatic zones. **Sci. Silv. Sin.** 2022, 58, 70–79.

DAI, H.; ZANG, H.; ZHAO, Y. et al. Linking bacterial community to aggregate fractions with organic amendments in a sandy soil. **Land Degrad Dev.** 2019; 30: 1828– 1839. <https://doi.org/10.1002/ldr.3383>

DALAL, R. C.; THORNTON, C. M.; ALLEN, D. E.; OWENS, J. S.; KOPITTKE, P. M (2021). Long-term land use change in Australia based on native forest decreases all fractions of soil organic carbon, including resistant organic carbon, for cultivation but not for seeded pasture. **agri. Ecosys. Environ.**311: 107326. doi: 10.1016 / j.agee.2021.107326.

DENG, J.; BAI, X.; ZHOU, Y.; ZHU, W.; YIN, Y. Variations of soil microbial communities accompanied by different vegetation restoration in an open-cut iron mining area. **Sci. Total Environ.** 2020, 704, 135243.

DE MENEZES, A. B.; PRENDERGAST-MILLER, M. T.; POONPATANA, P.; FARRELL, M.; BISSETT, A.; MACDONALD, L. M.; TOSCAS, P.; RICHARDSON, A. E.; THRALL, P. H. 2015. C/N Ratio Drives Soil Actinobacterial Cellobiohydrolase Gene Diversity. **Appl Environ Microbiol** 81:3016–3028.

DE SOUZA, J.C.; PEREIRA, M.A.; DA COSTA, E.N.D. et al. Nitrogen dynamics in soil solution under different land uses: Atlantic forest and cacao–cabruca system. **Agroforest Syst** 92, 425–435 (2018). <https://doi.org/10.1007/s10457-017-0077-6>

DIAGNE, N.; ARUMUGAM, K.; NGOM, M.; NAMBIAR-VEETIL, M.; FRANCHE, C.; NARAYANAN, K. K.; LAPLAZE, L. Use of Frankia and actinorhizal plants for degraded lands reclamation. **Biomed Res Int.** 2013;2013:948258. doi: 10.1155/2013/948258. Epub 2013 Nov 11. PMID: 24350296; PMCID: PMC3844217.

DORAN, J.W.; ZEISS, M.R. 2000. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. **Appl. Soil Ecol.** 15 (1), 3–11.

EICHORST, S. A.; TROJAN, D.; ROUX, S.; HERBOLD, C.; RATTEI, T.; WOEBKEN, D. (2018). Genomic insights into the Acidobacteria reveal strategies for their success in terrestrial environments. **Environmental Microbiology**, v. 20, n. 3, p. 1041-1063. doi:10.1111/1462-2920.14043

ELE, Y. S.; ELE, T. H.; FENG, Y. Q.; CUI, Q.; CHEN, X. Q. ; ZHAO, M. T.; QIU, W. J. Characteristics and distribution of soil bacteria from salt marshes on the Ordos shelf. **Minutes Ecol. Sin.** 2022, 42 , 3345–3355.

FAO. 2020. Global Soil Biodiversity Initiative (GSBI)., Secretariat of the Convention on Biological Diversity (SCBD)., & European Commission (EC). (2020). **State of knowledge of soil biodiversity – Status, challenges and potentialities.** <https://doi.org/10.4060/cb1928en>.

FAO. 2022. **Global status of black soils.** Rome. <https://doi.org/10.4060/cc3124en>

FAZI S.; AMALFITANO S.; PERNTHALER J.; PUDDU A. (2005). Bacterial communities associated with benthic organic matter in headwater stream microhabitats. **Environ. Microbiol.** 7 1633–1640. 10.1111/j.1462-2920.2005.00857.

FERREIRA, C.S.S.; SEIFOLLAHI-AGHMIUNI, S.; DESTOUNI, G.; GHAJARNIA,N.; KALANTARI, Z. Soil degradation in the European Mediterranean region: Processes, status and consequences, **Science of The Total Environment**, v.805, 2022, 150106, ISSN 0048-9697, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150106>.

FIERER, N.; SCHIMEL J. P.; HOLDEN, P. A (2003). Variations in microbial community composition across two soil depth profiles. **Soil Bio. Biochem.** 35 167–176. 10.1016/S0038-0717(02)00251-1

FINN, D.; YU, J.; C. PENTON, C. R. (2020). Soil quality shapes the composition of microbial community stress response and core cell metabolism functional genes. **Applied Soil Ecology**, 148(), 103483–. doi:10.1016/j.apsoil.2019.103483

FIRME, L.P. 2005. **Cinética de degradação microbiológica de torta de filtro no solo, na presença de cádmio e níquel.** 74f. (Dissertação de Mestrado em Agronomia). Escola Superior de Agronomia Luis de Queiroz. Universidade de São Paulo, Piracicaba.

FLECHARD, C. R et al. Effects of climate and management intensity on nitrous oxide emissions in grassland systems across Europe, Agriculture, **Ecosystems & Environment**, v. 121, Issues 1–2, 2007, pg. 135-152, ISSN 0167-8809, <https://doi.org/10.1016/j.agee.2006.12.024>.

GAMA-RODRIGUES, E.F.; BARROS, N.F.; GAMARODRIGUES, A.C.; SANTOS, G.A. Nitrogênio, carbono e atividade da biomassa microbiana do solo em plantações de eucalipto. **R. Bras. Ci. Solo**, 9:893-901, 2005.

GAMA-RODRIGUES, E.F., GAMA-RODRIGUES, A.C., NAIR, P.K.R., 2011. Soil carbono sequestration in cacao agroforestry systems: a case study from Bahia, Brazil. In: Kumar, B.M., Nair, P.K.R. (Eds.), Carbon Sequestration Potential of Agroforestry Systems. Advances in Agroforestry 8. **Springer**, New York, pp. 85–99.

GARAY, I; RIZZINI, M. (Org.). A Floresta Atlântica de Tabuleiros – Diversidade Funcional da Cobertura Arbórea. 2ª ed. **Petrópolis s: Vozes**, 2004. p. 16-26.

GAO, X.H.; LI, M.; LU, P.; LÜ, G.F.; NIU, Y.F. Bacterial community in the rhizosphere soil of *Betula platyphylla* in the Daqing Mountains, Hohhot. **Acta Ecol. Sin.** 2019, 39, 3586–3596.

GAO, J.; LIU, M.; SHI, S.; LIU, Y.; DUAN, Y.; LV, X.; BOHU, T.; LI, Y.; HU, Y.; WANG, N.; WANG, Q.; ZHUANG, G.; ZHUANG, X. Disentangling Responses of the Subsurface Microbiome to Wetland Status and Implications for Indicating Ecosystem Functions. **Microorganisms** 2021, 9, 211. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020211>.

GHOSH, S.; MOHANTY, S.; NAYAK, S.; SUKLA, L.; DAS, A. P. Molecular identification of indigenous manganese solubilising bacterial biodiversity from manganese mining deposits. **Journal of Basic Microbiology**. 2015;55:1–9. doi: 10.1002/jobm.201470403.

GHOSH, S.; DAS, A. P. Metagenomic insights into the microbial diversity in manganese-contaminated mine tailings and their role in biogeochemical cycling of manganese. **Scientific Reports**. 2018 May;8(1):8257. DOI: 10.1038/s41598-018-26311-w. PMID: 29844399; PMCID: PMC5974364.

GIUDITTA, E.; MARZAIOLI, R.; ESPOSITO, A.; ASCOLI, D.; STINCA, A.; MAZZOLENI, S.; RUTIGLIANO, F.A. Soil Microbial Diversity, Biomass, and Activity in

Two Pine Plantations of Southern Italy Treated with Prescribed Burning. **Forests** 2020, 11, 19. <https://doi.org/10.3390/f11010019>.

GOULART, K. C. S.; OMORI, W. P.; DE SOUZA, J. A. M. METAGENÔMICA APLICADA À BIOTECNOLOGIA. **Ciência & Tecnologia**, [S. l.], v. 5, n. 1, 2013. Disponível em: <https://citec.fatecjaboticabal.edu.br/index.php/citec/article/view/53>. Acesso em: 25 jul. 2022.

GRABER, D.R.; JONES, W.A.; JOHNSON, J.A. Human and ecosystem health. **J. Agromedicine**, 1995, 2, 47–64.

GROSSI, G.; GOGLIO, P.; VITALI, A.; WILLIAMS, A. Livestock and climate change: Impact of livestock on climate and mitigation strategies. **Animal Frontiers**. v.9. 2018. DOI - 10.1093/af/vfy034

GIULIANI, S. E.; FRANK, A. M.; CORGLIANO, D. M.; SEIFERT, C.; HAUSER, L.; COLLART, F. R. Environment sensing and response mediated by ABC transporters. **BMC Genomics**, v. 12, n. SUPPL. 1, p. 1–14, 2011.

GUO, X et al. Taxonomic and Functional Responses of Soil Microbial Communities to Annual Removal of Aboveground Plant Biomass. *Frontiers in Microbiology*. v.9. 2018. 1664-302X. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00954>.

GUO, J.; LING, N.; CHEN, Z.; XUE, C.; LI, L.; LIU, L.; GAO, L.; WANG, M.; RUAN, J.; GUO, S.; VANDENKOORNHUYSE, P.; SHEN, Q. 2020. Soil fungal assemblage complexity is dependent on soil fertility and dominated by deterministic processes. **New Phytologist**, 226, 232–243.

HEGYI A.; NGUYEN, T. B. K.; POSTA, K. Metagenomic Analysis of Bacterial Communities in Agricultural Soils from Vietnam with Special Attention to Phosphate Solubilizing Bacteria. **Microorganisms**. 2021 Aug 24;9(9):1796. doi: 10.3390/microorganisms9091796. PMID: 34576692; PMCID: PMC8472641.

HILL, P.; KRIŠTÚFEK, V.; DIJKHUIZEN, L.; BODDY, C.; KROETSCH, D.; VAN, E. J. D. (2011). Land use intensity controls actinobacterial community structure. **Microb. Ecol.** 61, 286–302. doi: 10.1007/s00248-010-9752-0

HIRSCH, P. R.; MAUCLINE, T. H. (2015). The importance of the microbial N cycle in soil for crop plant nutrition. In *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 93). **Elsevier Ltd**. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2015.09.001>

HOWE, A.; WILLIAMS, R. J.; YANG, F.; MEYER, F.; HOFMOCKEL, K. S. Characterization of central carbon cycling genes in fertilized prairie soils. **PLoS One** , 11 (2016) , p. e01665781–14

HU, C. W.; CHANG, Y. L.; CHEN, S. J.; KUO-HUANG, L. L.; LIAO, J. C.; HUANG, H. C.; JUAN, H. F. Revealing the functions of the transketolase enzyme isoforms in *Rhodospseudomonas palustris* using a systems biology approach. **PLoS One**. 2011;6(12):e28329. doi: 10.1371/journal.pone.0028329. Epub 2011 Dec 8. PMID: 22174789; PMCID: PMC3234253.

HU, J.; JIN, V. L.; KONKEL, J. Y. M.; SCHAEFFER, S. M.; SCHNEIDER, L. G.; DE BRUYN, J. M. Soil Health Management Enhances Microbial Nitrogen Cycling Capacity and Activity. **mSphere**. 2021 Jan 13;6(1):e01237-20. doi: 10.1128/mSphere.01237-20. PMID: 33441406; PMCID: PMC7845608.

HÜGLER, M.; FUCHS, G. Assaying for the 3-hydroxypropionate cycle of carbon fixation. **Methods in Enzymology**, v. 397, n. 1995, p. 212–221, 2005.

ITPS, 2020. Towards a definition of soil health. ITPS Soil Lett. 1. <https://www.fao.org/3/cb1110en/cb1110en.pdf>.

JACKSON, R. B.; LAJTHA, K.; CROW, S. E.; HUGELIUS, G.; KRAMER, M. G.; PIÑEIRO, G. (2017). The ecology of soil carbon: Pools, vulnerabilities and biotic and abiotic controls. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 48, 419-445. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-112414-054234>.

JANSSON, J. K.; HOFMOCKEL, K. S. Soil microbiomes and climate change. **Nat Rev Microbiol** 18, 35–46 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0265-7>

JENKINSON, D.S.; LADD, J.N. (1981) – Microbial biomass in soil: measurement and turnover. In: Paul, E.A. & Ladd, J.N. (Eds.) – **Soil Biology and Biochemistry**. New York, Marcel Decker, p. 415-471.

JI, L.; NI, K.; WU, Z.; ZHANG, J.; YI, X.; YANG, X.; LING, N.; YOU, Z.; GUO, S.; RUAN, J. 2020. Effect of organic substitution rates on soil quality and fungal community composition in a tea plantation with long-term fertilization. **Biology and Fertility of Soils**, 56, 633–646.

JI, M.; WILLIAMS, T. J.; MONTGOMERY, K.; WONG, H. L.; ZAUGG, J.; BERENGUT, J. F.; BISSETT, A.; CHUVOCHINA, M.; HUGENHOLTZ, P.; FERRARI, B. C. Candidatus Eremiobacterota, a metabolically and phylogenetically diverse terrestrial phylum with acid-tolerant adaptations. **ISME J**. 2021 Sep;15(9):2692-2707. doi: 10.1038/s41396-021-00944-8. Epub 2021 Mar 22. PMID: 33753881; PMCID: PMC8397712.

JIA, S.; LIANG, A.; ZHANG, S.; CHEN, X.; MCLAUGHLIN, N. B.; SUN, B., et al. (2021). Effect of Crop System on Soil CO₂ Flow, Soil Microbial Community and Corn (*Zea mays* L.) Yield. **Geoderma**, 384, 114813. doi: 10.1016/j.geoderma.2020.114813.

JIAN-YU, J.; LI, F.; ZHENG-SHUANG, H.; LAN, L.; NIMAICHAND, S.; PENG-FEI, L.; AI-PING, L.; GENG, W.; WEN-DONG, X.; QIYUN, Z.; EN-MIN, Z.; BAO-ZHU, F.; AHARON, O.; BRIAN, P. H.; HONG-CHEN, J.; ROB, K.; LEI, C.; WEN-JUN, L. (2021). Insight into the function and evolution of the Wood–Ljungdahl pathway in Actinobacteria. **The ISME Journal**. doi:10.1038/s41396-021-00935-9

JIAO, S.; CHEN, W. M.; WANG, J. L.; DU, N. N.; LI, Q. P.; WEI, G. H. (2018). Soil microbiomes with distinct assemblies through vertical soil profiles drive the cycling of multiple nutrients in reforested ecosystems. **Microbiome**, 6, 146. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0526-0>.

JUNIOR, P. R. R.; ANDRADE, F. V.; MENDONÇA, E. S.; DONAGEMMA, G. K.; FERNANDES, R. B. A.; BHATTARAI, R.; KALITA, P. K. Soil, water, and nutrient losses from management alternatives for degraded pasture in Brazilian Atlantic Rainforest biome, **Science of The Total Environment**, v. 583, 2017, p.53-63, ISSN 0048-9697, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.187>.

JOHAN, P.D.; AHMED, O.H.; OMAR, L.; HASBULLAH, N.A. Phosphorus Transformation in Soils Following Co-Application of Charcoal and Wood Ash. **Agronomy** 2021, 11, 2010. <https://doi.org/10.3390/agronomy11102010>

KALAM, S.; BASU, A.; AHMAD, I.; SAYYED, R. Z.; EL-ENSHASY, H. A.; DAILIN, D. J.; SURIANI, N. L. Recent Understanding of Soil Acidobacteria and Their Ecological Significance: A Critical Review. **Front Microbiol.** 2020 Oct 30;11:580024. doi: 10.3389/fmicb.2020.580024. PMID: 33193209; PMCID: PMC7661733.

KHAN, M. A. W.; B.J.M. BOHANNAN, B. J. M.; NÜSSLEIN, K.; TIEDJE, J. M.; TRINGE, S.G.; PARLADE, E.; BARBERÁN, A.; RODRIGUES, J. L. M. Deforestation impacts network co-occurrence patterns of microbial communities in Amazon soils. **FEMS Microbiol. Ecol.**, 95 (2019), p. fiy230, 10.1093/femsec/fiy230.

KENNEDY, A.C.; PAPENDICK, R.I. 1995. Microbial characteristics of soil quality. **Journal of Soil and Water Conservation**, 50, 243–248.

KIERULFF, M. C.; AVELAR, L. H. S.; FERREIRA, M. E. S.; POVOA, K. F.; BERNILS, R. S (2014) Reserva Natural Vale: História e aspectos físicos. **Ciência & Ambiente** 49: 7–40.

KIM, K; LEE, S; YOUNG, J. S; FINNERAN, K. T; KWON, M. J; (2021). Diversity and composition of soil Acidobacteria and Proteobacteria communities as a bacterial indicator of past land-use change from forest to farmland. **Science of The Total Environment**, doi:10.1016/j.scitotenv.2021.148944

KONISHI, N.; ISHIYAMA, K.; MATSUOKA, K.; MARU, I.; HAYAKAWA, T.; YAMAYA, T.; KOJIMA, S. NADH-dependent glutamate synthase plays a crucial role in assimilating ammonium in the Arabidopsis root. **Physiol Plant.** 2014 Sep;152(1):138-51. doi: 10.1111/ppl.12177. Epub 2014 Apr 2. PMID: 24576214.

KOUR, D et al. Biodiversity, current developments and potential biotechnological applications of phosphorus-solubilizing and-mobilizing microbes: A review. **Pedosphere**, v. 31, n. 1, p. 43-75, 2021.

KRAFT, E et al. Edaphic fauna affects soybean productivity under no-till system. **Scientia Agricola**, v. 78, n. 2, 2021.

KROEGER, M. E.; DELMONT, T. O.; EREN, A. M.; MEYER, K. M.; GUO, J.; KHAN, KIRAN.; RODRIGUES, J. L. M.; BOHANNAN, B. J. M.; TRINGE, S. G.; BORGES, C. D.; TIEDJE, J. M.; TSAI, S. M.; NÜSSLEIN, KLAUS. New Biological Insights Into How Deforestation in Amazonia Affects Soil Microbial Communities Using Metagenomics and Metagenome-Assembled Genomes. **Frontiers in Microbiology**.V.9. 2018 . <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01635> . DOI-10.3389/fmicb.2018.01635. ISSN=1664-302X

LAMBAIS, M. R.; CURY, C. J.; MALUCHE-BARETTA, C. R.; BÜLL, R. C. Diversidade microbiana nos solos: definindo novos paradigmas. **Tópicos em Ciência do Solos**, Viçosa, v. 4, p.43-84, 2005.

LAL, R.; BOUMA, J.; BREVIK, E.; DAWSON, L.; FIELD, D. J.; GLASER, B., et al. (2021). United Nations soils and sustainable development goals (New York, USA): an IUSS perspective. **Geoderm Reg.** 25: e00398. doi: 10.1016 / j.geodrs.2021.e00398.

LAUBER, C. L.; HAMADY, M.; KNIGHT, R.; FIERER, N. 2009. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. **Appl Environ Microbiol** 75:5111–5120.

LEE, S.; KIM, H.; YANG, J.E; RYU, H.-S.; MOON, J.; LEE, J.-Y.; LEE, H. Comparison of Microbial Gene Diversity in Grassland Topsoil Depending on Soil Quality. **Appl. Sci.** 2021, 11, 9569. <https://doi.org/10.3390/app11209569>

LEHMANN, J.; BOSSIO, D. A.; KÖGEL-KNABNER, I.; AND RILLIG, M. C. (2020). The Concept and Future Prospects of Soil Health. **Nat. Rev. Earth Environ.** 1, 544–553. doi:10.1038/s43017-020-0080-8.

LEMANCEAU, P.; MARON, P. A.; MAZURIER, S. et al. Understanding and managing soil biodiversity: a major challenge in agroecology. **Agron. Sustain. Dev.** 35, 67–81 (2015). <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0247-0>

LI, F.; CHEN, L.; REDMILE-GORDON, M et al. *Mortierella elongata*'s roles in organic agriculture and crop growth promotion in a mineral soil. **Land Degrad Dev.** 2018; 29: 1642–1651. <https://doi.org/10.1002/ldr.2965>.

LIAO, J.; XU, Q.; XU, H.; HUANG, D. Natural Farming Improves Soil Quality and Alters Microbial Diversity in a Cabbage Field in Japan. **Sustainability** 2019, 11, 3131; doi:10.3390/su11113131.

LIMA, M. S.; DE, FREIRE, F. J.; MARANGON, L. C.; ALMEIDA, B. G. DE.; RIBEIRO, E. P.; SANTOS, R. L. DOS. (2018). SOLOS FLORESTAIS EM FRAGMENTO DE FLORESTA URBANA NA MATA DE DOIS IRMÃOS, RECIFE, PERNAMBUCO, BRASIL. **Ciência Florestal**, 28(2), 542–553. <https://doi.org/10.5902/1980509832037>

LIU, Y.; TIAN, Y.; YUE, L.; CONSTANTINE, U.; ZHAO, X.; ZHOU, Q. et al. Effectively controlling *Fusarium* root rot disease of *Angelica sinensis* and enhancing soil fertility with a novel attapulgitite-coated biocontrol agent. **Applied Soil Ecology**, v. 168, 104121. <<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104121>>, 2021.

LIU, M.; LI, X.; ZHU, R.; CHEN, N.; DING, L.; CHEN, C. Vegetation richness, species identity and soil nutrients drive the shifts in soil bacterial communities during restoration process. **Environ. Microbiol. Rep.** 2021, 13, 1758–2229.

LIU, J.; MBADINGA, S. M.; SUN, X.; YANG, G.; YANG, S.; GU, J.; MU, B. Microbial communities responsible for fixation of CO₂ revealed by using *mcrA*, *cbbM*, *cbbL*, *fthfs*,

fehydrogenase genes as molecular biomarkers in petroleum reservoirs of different temperatures, **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 114, 2016, Pg.164-175, ISSN 0964-8305, <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.06.019>.

LU, H.; CHANDRAN, K.; STENSEL, D. Microbial ecology of denitrification in biological wastewater treatment, **Water Research**, V.64, 2014, Pages 237-254, ISSN 0043-1354, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.06.042>.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. Visão geral dos vírus e virologia. In: MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, cap. 23. p. 674-693, 2010.

MAHMUD, K.; PANDAY, D.; MERGOUM, A.; MISSAOUI, A. Nitrogen losses and potential mitigation strategies for a sustainable agroecosystem. **Sustainability** 2021, 13, 2400.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo, Agronômica Ceres, 2006.

MALIK, A.A.; PUISSANT, J.; BUCKERIDGE, K.M. et al. Land use driven change in soil pH affects microbial carbon cycling processes. **Nat Commun** 9, 3591 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05980-1>.

MARTIN, J.A.R.; ALVARO-FUENTES, J.; GONZALO, J.; GIL, C.; RAMOS-MIRAS, J.J.; CORBI, J.M.G.; BOLUDA, R. Assessment of the soil organic carbon stock in Spain. **Geoderma**, v. 264 (part A), p.117-125, 2016.

MARTÍNEZ-MENA, M.; PEREZ, M.; ALMAGRO, M.; GARCIA-FRANCO, N.; E DÍAZ-PEREIRA, E. (2021). Long-term effects of sustainable management practices on soil Properties and crop yields in dryland Mediterranean almond agroecosystems. **EUR. J. Agron.** 123, 126207. doi: 10.1016/j.eja.2020.126207.

MIERZWA-HERSZTEK M.; WOLNY-KOŁADKA K.; GONDEK K.; GAŁĄZKA A.; GAWRYJOLEK K. 2020. Effect of coapplication of biochar and nutrients on microbiocenotic composition, dehydrogenase activity index and chemical properties of sandy soil. **Waste and Biomass Valorization**, 11, 3911-3923, <https://doi.org/10.1007/s12649>.

MIRANDA, E.D.; ATTORRE, F.; AZEVEDO, J.; BELEN, I.; ALCALDE, E.E.; FREITAS, H.; GARAVAGLIA, V.; HÓDAR, J.A.; IRITAS, O.; KARAASLAN, Y.; KHATER, C.; KOUTSIAS, N.; MAKINSON, D.; MANSOUR, S.; PETTENELLA, D.; PICARD, N.; PINO, J.; VIEIRA, J.; VIALE, M. 2018. Drivers of degradation and other threats. In: FAO and Plan Bleu. 2018. State of Mediterranean Forests 2018. Food and Agriculture Organization of the United Nations, **Rome and Plan Bleu**, Marseille. Chapter 1, pp. 2-15.

MOCALI, S.; BENEDETTI, A. (2010). Exploring the frontiers of microbiology research: the challenge of metagenomics in soil microbiology. **Research in Microbiology**, 161, 497-505.

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

MONROE, P. H. M.; GAMA-RODRIGUES E. F.; GAMA-RODRIGUES, A. C.; MARQUES, J. R. B. Soil carbon stocks and origin under different cacao agroforestry systems in Southern Bahia, Brazil, Agriculture, **Ecosystems & Environment**, V. 221, 2016, Pg 99-108, ISSN 0167-8809, <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.01.022>.

MUCHANE, M. N.; SILESHI, G. W.; GRIPENBERG, S; JONSSON, M; PUMARIÑO, L; BARRIOS, E (2020). Agroforestry boosts soil health in the humid and sub-humid tropics: A meta-analysis. Agriculture, **Ecosystems & Environment**, 295(), 106899–. doi:10.1016/j.agee.2020.106899

NANNIPIERI, P.; GREGO, S.; CECCANTI, B. 1990. Ecological significance of the biological activity in soil. In: **Soil Biochemistry**, Volume 6 (eds J.-M. Bollag & G. Stotzky), pp. 293 – 355. Marcel Dekker, New York.

NATH, C. P et al. Greenhouse gases emission, soil organic carbon and wheat yield as affected by tillage systems and nitrogen management practices. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 63, n. 12, p. 1644-1660, 2017.

NILSSON, R. H.; LARSSON, K-H.; TAYLOR, A. F. S.; BENGTSSON-PALME, J.; JEPPESEN, T. S.; SCHIGEL, D.; KENNEDY, P.; PICARD, K.; GLÖCKNER, F. O.; TEDERSOO L, S. A. A. R. I.; KÖLJALG, U.; ABARENKOV, K. 2018. The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. **Nucleic Acids Research**, DOI: 10.1093/nar/gky1022.

NJIRA, K. O. W.; NABWAMI, J. Soil management practices that improve soil health: Elucidating their implications on biological indicators. **J. An. Pl. Sci**, 18: 2750-2760, 2013.

OGOLA H. J. O.; RAMGANESH,S.; MEMORY, T. Local Geomorphological Gradients and Land Use Patterns Play Key Role on the Soil Bacterial Community Diversity and Dynamics in the Highly Endemic Indigenous Afrotropical Coastal Scarp Forest Biome. **Frontiers in Microbiology**, v.12,2021. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.592725>. DOI=10.3389/fmicb.2021.592725, ISSN=1664-302X

OLIVEIRA, R. R. M.; SILVA, R; NUNES, G. L.; OLIVEIRA, G. PIMBA: A Pipeline for MetaBarcoding Analysis. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE BIOINFORMÁTICA (BSB), 14. , 2021, Online. Anais [...]. **Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Computação**, 2021 . p. 106-116.

OZIMEK, E.; HANAKA, A. Mortierella Species as the Plant Growth-Promoting Fungi Present in the Agricultural Soils. **Agriculture** 2021, 11, 7. <https://doi.org/10.3390/agriculture11010007>

PACE, N. R.; DA, S.; LANE, D. J.; OLSEN, G. J. " The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences", in *Advances in Microbial Ecology*, MK Cou, Ed., pp. 1-55, **Springer**, Boston, MA, EUA, 1986.

PASHAEI, R.; ZAHEDIPOUR-SHESHGLANI, P.; DZINGELEVIČIENĖ, R. et al. Effects of pharmaceuticals on the nitrogen cycle in water and soil: a review. **Environ Monit Assess** 194, 105 (2022). <https://doi.org/10.1007/s10661-022-09754-7>

PAVAN-KUMAR, A.; GIREESH-BABU, P.; LAKRA, W. S. DNA metabarcoding: a new approach for rapid biodiversity assessment. **J Cell Sci Mol Biol**, v. 2, n. 1, p. 111, 2015.

PEIXOTO, A.L.; GENTRY, A. 1990. Diversidade e composição florística da Mata de Tabuleiro na Reserva Florestal de Linhares (Espírito Santo, Brasil). **Revista Brasileira de Botânica** 13: 19-25.

PEIXOTO, A.L.; SILVA, I.M. 1997. Tabuleiro forests of Northern Espírito Santo, South-eastern Brazil. In: Davis, S.D.; Heywood, V.H.; Herrera-Macbride, O.; Villa-Lobos, J.; Hamilton, A.C. (eds.). *Centres of Plant Diversity: a guide and strategy for their conservation*. Cambridge, **IUCN Publications Unit**. p. 369-372.

PREZOTTI, L.C.; GOMES, J.A.; DADALTO, G.G.; OLIVEIRA, J.A. de. **Manual de Recomendação de Calagem e Adubação para o Estado do Espírito Santo**. 5ª aproximação. Vitória, ES, SEEA/INCAPER/CEDAGRO, 2007.

POWLSON, D. S.; BROOKES, P. C.; CHRISTENSEN, B. T. Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in total soil organic matter due to straw incorporation. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 19, p. 159-164, 1997.

PURKAMO, L.; BOMBERG, M.; NYSSONEN, M.; AHONEN, L.; KUKKONEN, I.; ITAVAAR, M. Response of Deep Subsurface Microbial Community to Different Carbon Sources and Electron Acceptors during ~2 months Incubation in Microcosms. **Frontiers in Microbiology**. V.8,.DOI=10.3389/fmicb.2017.00232 ISSN=1664-302X, 2017.

QIAN, C.; HETTICH, R.L. Optimized Extraction Method To Remove Humic Acid Interferences from Soil Samples Prior to Microbial Proteome Measurements. **J. Proteome Res.** 2017, 16, 2537–2546.

RASHID, M. I et al. Bacteria and fungi can contribute to nutrients bioavailability and aggregate formation in degraded soils. **Microbiological research**, v. 183, p. 26-41, 2016.

REN, N.; WANG, Y.; YE, Y.; ZHAO, Y.; HUANG, Y.; FU, W.; CHU, X. Effects of Continuous Nitrogen Fertilizer Application on the Diversity and Composition of Rhizosphere Soil Bacteria. **Front Microbiol.** 2020 Aug 21;11:1948. doi: 10.3389/fmicb.2020.01948. PMID: 32973705; PMCID: PMC7472254.

ROCHA F. I.; RIBEIRO, T. G.; FONTES, M.A.; SCHWAB, S.; COELHO, M. R.R. ; LUMBRERAS, J.F.; DA MOTTA, P. E. F.; TEIXEIRA, W. G.; COLE, J.; BORSANELLI, A.C.; DUTRA, I. S.; HOWE, A.; DE OLIVEIRA, A.P.; JESUS, E. C. Land-Use System and Forest Floor Explain Prokaryotic Metacommunity Structuring and Spatial Turnover in Amazonian Forest-to-Pasture Conversion Areas. **Frontiers in Microbiology**, V.12 ,2021, DOI=10.3389/fmicb.2021.657508, ISSN=1664-302X

RODRÍGUEZ, C. B.; DURÁN-ZUAZO, V. H.; RODRÍGUEZ, S. M.; GARCÍA-TEJERO, I. F.; RUIZ, G. B.; TAVIRA, C. S. Conservation Agriculture as a Sustainable System for Soil Health: A Review. **Soil Syst.** 2022, 6, 87. <https://doi.org/10.3390/soilsystems6040087>.

ROLIM, S.G.; MENEZES, L. F. T.; SRBEK-ARAUJO, A. C . 2016. Floresta Atlântica de Tabuleiro: diversidade e endemismos na Reserva Natural Vale. **Editora Rupestre**. ISBN: 978-85-62805-63-9

ROMANO-ARMADA, N.; YAÑEZ-YAZLLE, M.F.; IRAZUSTA, V.P.; RAJAL, V.B.; MORAGA, N.B. Potential of Bioremediation and PGP Traits in *Streptomyces* as Strategies for Bio-Reclamation of Salt-Affected Soils for Agriculture. **Pathogens** 2020, 9, 117. <https://doi.org/10.3390/pathogens9020117>

SAHA, J.; SENGUPTA, A.; GUPTA, K.; GUPTA, B. Molecular phylogenetic study and expression analysis of ATP-binding cassette transporter gene family in *Oryza sativa* in response to salt stress, **Computational Biology and Chemistry**, v. 54, 2015, Pg. 18-32, ISSN 1476-9271, <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2014.11.005>.

SAITER, F. Z.; ROLIM, S. G.; JORDY FILHO, S.; OLIVEIRA-FILHO, A. T. (2017) Uma revisão sobre a controversa classificação fisionômica da Floresta de Linhares, norte do Espírito Santo. **Rodriguésia**, 68(5):1987- 1999. doi: 10.1590/2175-7860201768529.

SAMARAKOON, T.; WANG, S.Y.; ALFORD, M.H. 2013. Enhancing PCR amplification of DNA from recalcitrant plant specimens using trehalose-based additive. **Applic. Pl. Sci.** 1: 1200236. <https://doi.org/10.3732/apps.1200236>.

SANTOS, E. C. **Metaproteômica e bioquímica de solos contaminados por hidrocarbonetos e metais pesados**. 2008. 188p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP. Disponível em: <<http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/254749>>. Acesso em: 01 jan. 2022.

SCHIEBENHOEFER, H. et al. Challenges and promise at the interface of metaproteomics and genomics: an overview of recent progress in metaproteogenomic data analysis. **Expert Rev. Proteom.** 16, 375–390 (2019).

SCHOLES, Robert et al. Summary for policymakers of the assessment report on land degradation and restoration of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services. **IPBES Secretariat: Bonn, Germany**, 2018.

SHRINIVAS, N. S.; PADMAJA P. S.; KRISHNARAJ, P.U. **Soil Metagenomics: Concepts and Applications** .Wael N. Hozzein, Metagenomics. 2019. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88958>.

SHIDA, J. I.; ZHIHUA, L.; BIN, L.; YUCHENG, W.; JINJIE, W. The effect of *Trichoderma* biofertilizer on the quality of flowering Chinese cabbage and the soil environment, **Scientia Horticulturae**, Volume 262, 2020, 109069, ISSN 0304-4238, <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109069>.

SHIVLATA, L.; SATYANARAYANA, T. Thermophilic and alkaliphilic Actinobacteria: biology and potential applications. **Front Microbiol.** 2015 Sep 25;6: 1014. doi: 10.3389/fmicb.2015.01014. PMID: 26441937; PMCID: PMC4585250.

SIMON, C.; DANIEL, R. **Metagenomic analyses: past and future trends Applied and Environmental Microbiology**, 77 (2011), pp. 1153-1161.

SINGER, M. J.; WARKENTIN, B. P. **Soil in an environmental context: An American perspective**. *Catena* 1996, 27, 179–189.

SINGH, A.; NYLANDER, J. A. A.; SCHNÜRER, A.; BONGCAM-RUDLOFF, E.; MÜLLER, B. Throughput Sequencing and Unsupervised Analysis of Formyltetrahydrofolate Synthetase (FTHFS) Gene Amplicons to Estimate Acetogenic Community Structure. **Frontiers in Microbiology**.v.11,2020, ISSN=1664-302X , DOI: 10.3389/fmicb.2020.02066

SINSABAUGH, R.L.; REYNOLDS, H.; LONG, T. M. Rapid assay for amidohydrolase (urease) activity in environmental samples. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, Issue 14, 2000, Pg. 2095-2097, ISSN 0038-0717, [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00102-4](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00102-4).

SPAIN, A. M.; KRUMHOLZ, L.R.; ELSHAHED, M. S. Abundance, composition, diversity and novelty of soil Proteobacteria. **Int. Soc. Microb. Ecol. J.**, 3 (8) (2009), pp. 992-1000

STEELE, H. L.; STREIT, W. R. Metagenomics: Advances in ecology and biotechnology. **FEMS Microbiology Letters**, v. 247, p. 105–111, 2005.

TABITA, F.R.; HANSON, T. E.; LI, H. Y.; SATAGOPAN, S.; SINGH, J.; CHAN, S. 2007. Function, structure, and evolution of the RubisCO-like proteins and their RubisCO homologs. **Microbiol Mol Biol Rev.** 71: 576–599.

TANG, H.; LI, S.; YE, Y. A Graph-Centric Approach for Metagenome-Guided Peptide and Protein Identification in Metaproteomics. **PLoS Comput. Biol.** 2016, 12, e1005224.

TANG, Y. et al. Changes in nitrogen-cycling microbial communities with depth in temperate and subtropical forest soils. **Appl. Soil. Ecol.** 124, 218–228 (2018).

TARTAGLIA, M.; BASTIDA, F.; SCIARRILLO, R.; GUARINO, C. Soil Metaproteomics for the Study of the Relationships Between Microorganisms and Plants: A Review of Extraction Protocols and Ecological Insights. **Int. J. Mol. Sci.** 2020, 21, 8455. <https://doi.org/10.3390/ijms21228455>.

THOMAZINI, A.; MENDONÇA, E. S.; CARDOSO, I.M.; GARBIN, M.L. SOC dynamics and soil quality index of agroforestry systems in the Atlantic rainforest of Brazil, **Geoderma Regional**, V. 5, 2015, Pg 15-24, ISSN 2352-0094, <https://doi.org/10.1016/j.geodrs.2015.02.003>.

TRINDADE, F. C.; RAMOS, S. J.; GASTAUER, M.; SARAIVA, A. M. M.; CALDEIRA, C. F.; OLIVEIRA, G.; VALADARES, R. B. da S. Metaproteomes reveal increased capacity for stress tolerance of soil microbes in ferruginous tropical rocky outcrops. **Pedobiologia**, v. 81–82, n. July, p. 150664, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2020.150664>>.

TRIVEDI, P.; ANDERSON, I. C.; SINGH, B. K. (2013). Microbial modulators of soil carbon storage: integrating genomic and metabolic knowledge for global prediction. **Trends in Microbiology**, 21(12), 641–651. doi:10.1016/j.tim.2013.09.005

ULLAH, S.; CHAO, A.; JIANG, W. D. R.; ZHAO, S.; ZHANG, J.; ZHOU, W.; HOU, Y.; HE, P. The response of soil fungal diversity and community composition to long-term

fertilization, **Applied Soil Ecology**, Volume 140, 2019, Pages 35-41, ISSN 0929-1393, <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.03.025>.

UNITED NATIONS CONVENTION TO COMBAT DESERTIFICATION, 2022. **The Global Land Outlook**, second edition. UNCCD, Bonn. ISBN: 978-92-95118-53-9

VAN DER HEIJDEN, M. G. A.; BARDGETT, R. D.; VAN STRAALEN, N. M. (2008). The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. **Ecol Lett** 11: 296–310.

VESTERGAARD, G.; SCHULZ, S.; SCHÖLER, A.; SCHLOTTER, M. **Making big data smart—how to use metagenomics to understand soil quality Biology and Fertility of Soils**, 53 (2017), pp. 479-484.

WANG, X.; MCCONKEY, B.; VANDENBYGAART, A. et al. Grazing improves C and N cycling in the Northern Great Plains: a meta-analysis. **Sci Rep** 6, 33190 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep33190>

WANG, L.; XIONG, X. Long-Term Organic Manure Application Alters Urease Activity and Ureolytic Microflora Structure in Agricultural Soils. **Agronomy**. 2022, 12, 3018. <https://doi.org/10.3390/agronomy12123018>

WANG, Y.; ZHOU, X. Effects of Green Manures on Rhizosphere Fungal Community Composition of Cucumber Seedlings. **Curr Microbiol** 80, 87 (2023). <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03199-y>.

WARD, L. M.; JAMES, H.; SHIH, P. M.; MCGLYNN, S. E.; FISCHER, W. W. Evolution of Phototrophy in the Chloroflexi Phylum Driven by Horizontal Gene Transfer. **Frontiers in Microbiology**, v.9, 2018. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00260> . DOI:10.3389/fmicb.2018.00260

WALSH, C. M.; GEBERT, M. J.; DELGADO-BAQUERIZO, M.; MAESTRE, F. T.; FIERER, N. A Global Survey of Mycobacterial Diversity in Soil. **Appl Environ Microbiol**. 2019 Aug 14;85(17):e01180-19. doi: 10.1128/AEM.01180-19. PMID: 31253672; PMCID: PMC6696970.

WEBSTER, J.; WEBER, R. Introduction to fungi. **Cambridge university press**, 2007.

WHITE, R.A.; RIVAS-UBACH, A.; BORKUM, M.I.; KÖBERL, M.; BILBAO, A.; COLBY, S.M.; HOYT, D.W.; BINGOL, K.; KIM, Y.-M.; WENDLER, J.P.; et al. The state of rhizospheric science in the era of multi-omics: A practical guide to omics technologies. **Rhizosphere**, 2017, 3, 212–221.

WILMES, P.; BOND, P.L. The application of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and downstream analyses to a mixed community of prokaryotic microorganisms. **Environ Microbiol**, 6 (9) (2004), pp. 911-920, 10.1111/j.1462-2920.2004.00687.

YABE, S.; SAKAI, Y.; ABE, K.; YOKOTA, A. Diversity of Ktedonobacteria with Actinomycetes-Like Morphology in Terrestrial Environments. **Microbes Environ.** 2017 Mar 31;32(1):61-70. doi: 10.1264/jsme2.ME16144. Epub 2017 Mar 17. PMID: 28321007; PMCID: PMC5371077.

YANG, X.; NIAN, J.; XIE, Q.; FENG, J.; ZHANG, F.; JING, H.; ZHANG, J.; DONG, G.; LIANG, Y.; PENG, J.; WANG, G.; QIAN, Q.; ZUO, J. Rice Ferredoxin-Dependent Glutamate Synthase Regulates Nitrogen-Carbon Metabolomes and Is Genetically Differentiated between japonica and indica Subspecies. **Mol Plant.** 2016 Nov 7;9(11):1520-1534. doi: 10.1016/j.molp.2016.09.004. Epub 2016 Sep 24. PMID: 27677460.

YANG, Y.; DOU, Y.; AN, S. Testing associação entre diversidade bacteriana do solo e armazenamento de carbono do solo no Planalto de Loess. **Sci. Total. Ambiente.** 2018; 626 :48. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.01.081.

YU, Z.; CHEN, L.; PAN, S.; LI, Y.; KUZYAKOV, Y.; XU, J.; BROOKES, P. C.; LUO, Y. 2018. Feedstock determines biochar-induced soil priming effects by stimulating the activity of specific microorganisms. **Eur J Soil Sci** 69:521–534. <https://doi.org/10.1111/ejss.12542>.

XIA, M.; TALHELM, A.F.; PREGITZER, K.S. Fine roots are the dominant source of recalcitrant plant litter in sugar maple-dominated northern hardwood forests. **New Phytol.** 2015, 208, 715–726.

XU, P.; LIU, Y.; ZHU, J.; SHI, L.; FU, Q.; CHEN, J.; HU, H.; HUANG, Q. (2020). Influence mechanisms of long-term fertilizations on the mineralization of organic matter in Ultisol. **Soil and Tillage Research**, 201, 104594–. doi:10.1016/j.still.2020.104594

ŽIFČÁKOVÁ, L.; VETROVSKÝ, T.; HOWE, A.; AND BALDRIAN, P. (2016). Microbial activity in forest soil reflects the changes in ecosystem properties between summer and winter. **Environ. Microbiol.** 18, 288–301. doi: 10.1111/1462-2920.13026.