UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

CINTIA CAROLINE GOUVEIA DA SILVA

MICROBIOMA DA TERRA PRETA DA AMAZÔNIA: COMPOSIÇÃO, DIVERSIDADE E FUNÇÕES

RECIFE 2023

Cintia Caroline Gouveia da Silva Bióloga

Microbioma da Terra Preta da Amazônia: composição, diversidade e funções

Tese apresentada ao Programa de Pósgraduação em Ciência do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciência do Solo.

Orientador: Profa. Dra. Giselle Gomes Monteiro Fracetto

Coorientador: Dr. Adriano Reis Lucheta

RECIFE 2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação Universidade Federal Rural de Pernambuco Sistema Integrado de Bibliotecas Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

 S586m Silva, Cintia Caroline Gouveia da MICROBIOMA DA TERRA PRETA DA AMAZÔNIA: COMPOSIÇÃO, DIVERSIDADE E FUNÇÕES / Cintia Caroline Gouveia da Silva. - 2023.
157 f. : il.

> Orientadora: Giselle Gomes Monteiro Fracetto. Coorientador: Adriano Reis Lucheta. Inclui referências e apêndice(s).

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Recife, 2023.

1. Análise Metagenômica. 2. Solos Antropogênicos. 3. Ecologia Microbiana. 4. Prospecção. 5. Sequenciamento. I. Fracetto, Giselle Gomes Monteiro, orient. II. Lucheta, Adriano Reis, coorient. III. Título

CDD 631.4

CINTIA CAROLINE GOUVEIA DA SILVA

Microbioma da Terra Preta da Amazônia: composição, diversidade e funções

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciência do Solo.

Aprovada em 14 de abril de 2023

Profa. Dra. Giselle Gomes Monteiro Fracetto Orientadora Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Erika Valente de Medeiros Universidade Federal do Agreste de Pernambuco - UFAPE

> Prof. Dr. Arthur Prudêncio de Araújo Pereira Universidade Federal do Ceará - UFC

Dr. Adriano Reis Lucheta Instituto SENAI de Inovação em Tecnologias Minerais - ISITM

> Dr. Felipe Martins do Rêgo Barros Universidade de São Paulo - USP

DEDICO

A minha eterna mainha, Célia Cristina (in memoriam), uma mulher de muita fé e coração tão sensível. Com ela eu aprendi o significado da empatia e a importância de ajudar o próximo, nas suas tantas histórias de pacientes que encontrou em situação vulnerável ao longo da sua jornada, pelos hospitais, na profissão que ela tanto amava. Foram tantos ensinamentos, brigas, palavras de correção, mas também de muito amor... E eu nunca vou esquecer aquele último "eu te amo tanto filha" com a voz rouca. Ela foi minha primeira professora que com o passar dos anos se tornou minha aluna nas nossas brincadeiras de escolinha durante a pandemia. Ainda que eu escrevesse um livro não seria suficiente para descrever tamanha saudade que eu sinto de te dar bom dia, de tomar café da manhã contigo, de te pedir a benção para ir na esquina de casa, das tuas gargalhadas nas festas da família, de te levar para passear no shopping e ser tua motorista.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, por ter me guiado durante toda essa jornada e me sustentado no momento mais difícil e doloroso da minha vida, colocando as pessoas certas no momento certo para caminharem comigo.

A minha família, em especial a mainha (*in memorian*) e painho que desde criança me ensinaram o valor da educação e onde ela poderia me levar. Mainha sempre ao meu lado, incentivando, apoiando e acreditando nos meus sonhos até mais do que eu mesmo. Sempre motivando: "mainha faz"; "mainha ajuda"; "mainha vai contigo", mainha vai lavar seus pratos (as vidrarias no laboratório). Painho sempre fez de tudo para que não nos faltasse nada, principalmente educação. Durante muitos anos e até hoje isso nos custa sua ausência física em datas especiais. Como eu me alegro painho em poder te dizer: missão cumprida comandante. Obrigada por sonharem os meus sonhos comigo, por serem o meu alicerce e acreditarem tanto em mim. Ao meu irmão e companheiro de vida, obrigada por me suportar, aguentar meus gritos e reclamações. Ao meu filhinho de 4 patas (Maik) que foi um companheiro fiel durante o processo de escrita e que nos enche de felicidade há quase 17 anos.

Aos Gouveias (Minha grande família), sem vocês eu não conseguiria chegar até aqui. Somos tão gigantes que passamos 30 dias fazendo mutirão de visita naquele hospital e ficamos conhecidos como a família de Dona Célia. Vocês são meu combustível, minha fonte de energia renovável, meu local de amor e acolhimento, mainha me deixou muito bem amparada. Aos meus avós (vovó Lizete e vovô Severino) – *in memoriam*, as minhas tias e tios (Leque, Adriana, Tiane, Suely, Sula, Licinha, Madrinha-Alda, Rose, Erivan, João, Antônio, Nido e Carlinho), a minha tia-avó (titia Luzinete), aos meus primos e primas (Dani, Rafa, Vanessa, Roberson, Juli, Ana, Lipe, Jean, Eduarda, Márcio, Pollyane, Jéssica, Carina, Déia, Aline, Eduardo, Biel, Richelle, Jamilton, Junior, Fernanda e Ceci), a nossa 4ª geração (Heitor, Lorenna e Elloá), aos nossos agregados oficiais (Raquel, Carol, Maria e Elias). Eu não tenho dúvidas que vocês são o melhor de Deus na minha vida, como eu sou feliz em partilhar a vida com vocês. Nossas festas em família são sempre as melhores.

A minha amiga e orientadora, Giselle Fracetto, pela amizade, paciência, acolhimento e empatia. Obrigada por segurar minha mão lá em 2016, quando eu não sabia o que fazer e me mostrar que era possível sim fazer um mestrado e depois um doutorado. Naquela conversa, eu nem imaginava que seria a semente para uma amizade dessa proporção. A senhora é uma fonte de inspiração para mim pela mulher incrível que és, determinada, valente, destemida, uma

educadora e pesquisadora gigante. Nem sempre as nossas ideias se encontram, o que é normal porque somos pessoas diferentes, mas a nossa capacidade em reconhecer o erro e conversar quando o olhar está atravessado é incrível. Prof., obrigada por não me ensinar somente ciência, mas também sobre a vida. Mainha em suas sábias palavras me disse que a senhora iria me ajudar muito na vida e nos dias mais nebulosos quando eu não conseguia conter as minhas emoções por sentir falta dela a senhora estava ali comigo e para mim. Quantos dias saiu da sua casa e chegou no laboratório para me abraçar e consolar, outros eu não queria chorar sozinha e a senhora sempre de portas abertas me recebia em sua casa. Eu não posso deixar de agradecer ao prof., Felipe Fracetto, pela acolhida sempre perguntando se está tudo bem, oferecendo ajuda, perguntando pelo meu pai, se estamos precisando de algo. Um homem de coração muito bom e tamanha empatia, Deus faz tudo perfeito e não podia ser diferente quando uniu vocês dois. Obrigada prof., por sempre cozinhar comidas deliciosas para mim, fazer os melhores churrascos e os melhores lanches. São tantos momentos memoráveis de troca, amizade e cuidado ao longo desses anos nessa amizade tão bonita que foi ganhando robustez. Hoje o meu coração é só gratidão porque sei que sou parte da família de vocês, assim como vocês são parte da minha.

Aos amigos e irmãos de orientação, Felipe, Petrônio, Tiago, Lucía, Alysson, Flávia, Midouin e Nayara. A Victor, sempre muito solícito para ajudar e tirar dúvidas sobre as análises. Aos queridos, Diogo, Eduarda, Gabi e Gaby, vocês chegaram para me ajudar em um momento que eu já estava exausta, cheios de questionamentos, entusiasmo e vontade de aprender. Como foi prazeroso compartilhar conhecimento com vocês e ensinar um pouco do que aprendi ao longo desses anos no laboratório. Yure, meu companheiro de laboratório, como eu sinto tua falta. Mas fico muito feliz em te ver ganhando voos cada vez mais altos. Stella, minha grande amiga, nossa história começou ainda lá na iniciação científica e como eu sou feliz de poder cultivar essa amizade. Obrigada por sempre ouvir os meus desabafos, por me motivar, por me ajudar nos momentos difíceis de muito desespero, como, na estatística deste trabalho. Tenho uma admiração muito grande pela mãe, pesquisadora e professora que você está se tornando.

Aos amigos que fiz ao longo desses anos no Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da UFRPE, cada um de vocês tem uma história diferente comigo e me tocam num lugar especial. Danúbia, Emmanuella (Manu), Wagner, Marllon, William, Iderlane, Jamilly, Adriana, Maria Nazaré, Ana Luiza, Renato, Isabel, Jaciane, Danillo, Nara, Luiz, Francisco, Tiago, Marilya, Belchior, Frank, Aline, Juliet, Cinthia, Paula, Katerin e Rafael. Muito obrigada pelos ensinamentos nas disciplinas, pelas trocas nos laboratórios e pelos momentos de descontração, vocês foram muito importantes durante esse processo. Aos professores do Programa, pela disponibilidade e conhecimentos transmitidos me permitindo conhecer e me encantar por esse mundo chamado ciência do solo.

À Socorro Santana (Socorrinho; Help), pela disponibilidade e gentileza em ajudar. Ela sempre encontra um jeitinho para tudo.

Ao Instituto SENAI de Inovação em Tecnologias Minerais – Belém/PA, na pessoa do meu coorientador, Adriano Lucheta, pela iniciativa do projeto, convite para parceria, coleta das amostras e realização das análises metagenômicas.

Aos meus amigos de graduação Anderson Barboza, Aline Araújo, Mayara Souza, Beatriz Vasconcelos e Júnior Santos pelas conversas, motivação e apoio.

A todos que não foram citados, mas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Por fim, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela concessão da bolsa e a UFRPE pela disponibilidade e infraestrutura para o desenvolvimento desta pesquisa.

"Nunca me deixes esquecer Que tudo o que tenho Tudo o que sou, o que vier a ser Vem de Ti, Senhor"

Ana Paula Valadão

Microbioma da Terra Preta da Amazônia: composição, diversidade e funções

RESUMO GERAL

A Terra Preta da Amazônia (TPA) são solos de origem antropogênica que apresentam elevada fertilidade e conteúdo de matéria orgânica, diferentemente dos solos da região, contribuindo para o aumento da atividade microbiana. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade microbiana, processos metabólicos e transformações biogeoquímicas relacionados à manutenção da fertilidade e sustentabilidade da TPA e seu potencial biotecnológico por meio de técnicas moleculares e dependentes de cultivo. O solo do perfil de TPA e o dolo adjacente (ADJ) foram coletados na região da Amazônia Oriental, no município de Bragança, no estado do Pará, para realização das análises químicas, microbiológicas e granulometria. A prospecção de bactérias do perfil de TPA foi realizada pelo método de diluição seriada e, posteriormente, os isolados foram testados "in vitro" quanto aos mecanismos de promoção de crescimento de plantas: produção de Ácido Indol-Acético (AIA), sideróforos, solubilização de fosfato e fixação biológica de nitrogênio (FBN). Além disso, foram selecionados 52 isolados para extração de DNA, amplificação dos genes nifH e acdS e sequenciamento do gene 16S rRNA. O DNA total do solo foi extraído, quantificado e enviado para o sequenciamento do metagenoma. O solo de TPA foi classificado como Gleissolo A-Cg distrófico e a caracterização química revelou pH ácido tanto no perfil de TPA quanto no solo adjacente (ADJ), aumento de nutrientes em profundidade, baixa saturação por bases e elevada saturação por alumínio. O horizonte A, do solo oriundo da TPA, apresentou os maiores teores de glomalina. Dos 466 isolados do solo do perfil de TPA, 84 solubilizaram fosfato, 113 produziram AIA e 13 produziram sideróforos. Dos 149 isolados selecionados para a FBN, somente 3 foram negativos. Quanto à presença dos genes nifH e acdS, dos 52 isolados, 23 e 12 foram positivos, respectivamente. O sequenciamento do gene 16S rRNA revelou o predomínio dos gêneros Bacillus e Pseudomonas entre as amostras do perfil de TPA. A análise metagenômica revelou a presença de Acidobacteria, Proteobacteria, Chloroflexi e Actinobacteria como os filos dominantes nas amostras TPA e ADJ. Quanto às classes, Actinobacteria, Alphaproteobacteria, Deltaproteobacteria e Betaproteobacteria, foram as mais presentes e as ordens Rhizobiales, Acidobacteriales, Ktedonobacterales, Streptomycetales e Burkholderiales se destacaram em todas as amostras. Foi observada uma grande diversidade de famílias de bactérias, principalmente, Acidobacteriaceae, Streptomycetaceae, Solibacteriaceae e Bradyrhizobiaceae. Os gêneros e espécies predominantes foram: Streptomyces, Bradyrhizobium, **Candidatus** Sulfopaludibacter e Candidatus Sulfotelmatobacter; Acidobacteria bacterium, Chloroflexi bacterium, Candidatus Bathyarchaeota archeon, Terrabacteria group bacterium ANGP1, Actinobacteria bacterium, Alphaproteobacteria bacterium, Gammaproteobacteria bacterium, e Planctomycetes bacterium, respectivamente. Quanto ao perfil metabólico e funcional das amostras, foram encontradas evidências de proteínas e enzimas relacionadas as vias da glicólise, pentose, ciclo de Krebs, cadeia transportadora de elétrons, ciclo dos carboidratos, ciclo do N, S, metano, arsênio e mercúrio. De modo geral, os resultados encontrados no presente estudo revelaram o elevado potencial dos micro-organismos obtidos na TPA e sua capacidade de realizar importantes funções ecológicas garantindo o bom funcionamento do ecossistema.

Palavras-chave: Análise Metagenômica. Solos Antropogênicos. Ecologia Microbiana. Prospecção. Sequenciamento.

Microbiome of Terra Preta in the Amazon: composition, diversity and functions

GENERAL ABSTRACT

The Amazonian Dark Earth (ADE) are soils of anthropogenic origin that present high fertility and organic matter content, differently from the soils of the region, contributing to the increase of microbial activity. Thus, the present work aimed to evaluate microbial diversity, metabolic processes and biogeochemical transformations related to the maintenance of fertility and sustainability of ADE and its biotechnological potential through molecular and cropdependent techniques. The soil of the ADE profile and the adjacent soil (ADJ) were collected in the Eastern Amazon region, in the municipality of Braganca, Pará State, to perform chemical, microbiological and grain size analyses. The prospection of ADE profile bacteria was performed by serial dilution method and, subsequently, the isolates were tested "in vitro" for plant growth promoting mechanisms: Indole-Acetic Acid (IAA) production, siderophores, phosphate solubilization and biological nitrogen fixation (BNF). In addition, 52 isolates were selected for DNA extraction, amplification of the nifH and acdS genes, and sequencing of the 16S rRNA gene. Total soil DNA was extracted, quantified and sent for metagenome sequencing. The ADE soil was classified as dystrophic Gleysols A-Cg and chemical characterization revealed acidic pH in both the ADE profile and the adjacent soil (ADJ), increased nutrients at depth, low base saturation, and high aluminum saturation. The A horizon of the ADE soil had the highest levels of glomalin. Of the 466 isolates from the ADE soil profile, 84 solubilized phosphate, 113 produced IAA, and 13 produced siderophores. Of the 149 isolates selected for BNF, only 3 were negative. As for the presence of the nifH and acdS genes, of the 52 isolates, 23 and 12 were positive, respectively. Sequencing of the 16S rRNA gene revealed the predominance of the Bacillus and Pseudomonas genera among the samples in the ADE profile. Metagenomic analysis revealed the presence of Acidobacteria, Proteobacteria, Chloroflexi and Actinobacteria as the dominant phyla in the ADE and ADJ samples. As for the classes, Actinobacteria, Alphaproteobacteria, Deltaproteobacteria and Betaproteobacteria, were the most present and the orders Rhizobiales, Acidobacteriales, Ktedonobacterales, Streptomycetales and Burkholderiales stood out in all samples. A great diversity of bacterial families was observed, mainly, Acidobacteriaceae, Streptomycetaceae, Solibacteriaceae and Bradyrhizobiaceae. The predominant genera and species were Streptomyces, Bradyrhizobium, Candidatus Sulfopaludibacter, and Candidatus Sulfotelmatobacter; Acidobacteria bacterium, Chloroflexi bacterium, Candidatus Bathyarchaeota archeon, Terrabacteria group bacterium ANGP1, Actinobacteria bacterium, Alphaproteobacteria bacterium, Gammaproteobacteria bacterium, and Planctomycetes bacterium, respectively. As for the metabolic and functional profile of the samples, evidence was found of proteins and enzymes related to the glycolysis, pentose, Krebs cycle, electron transport chain, carbohydrate cycle, N, S cycle, methane, arsenic and mercury pathways. Overall, the results found in the present study revealed the high potential of microorganisms obtained in the TPA and their ability to perform important ecological functions ensuring the proper functioning of the ecosystem.

Keywords: Metagenomic Analysis. Anthropogenic Soils. Microbial Ecology. Prospecting. Sequencing.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo II – ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS
PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS ORIUNDAS DE UM PERFIL DE
TERRA PRETA DA AMAZÔNIA
Figura 1. Carta imagem do sítio arqueológico Jabuti
Figura 2. Perfil de Terra Preta da Amazônia no estado do Pará
Figura 3. Coleta das amostras de Terra Preta da Amazônia no estado do Pará
Figura 4. Extrato e curva para leitura de glomalina facilmente extraível
Figura 5. Isolados obtidos de um perfil de Terra Preta da Amazônia do Pará 59
Figura 6. Bactérias solubilizadoras de fosfato de cálcio da Terra Preta da Amazônia do Pará
Figura 7. Curva para leitura de ácido indol-acético (AIA)
Figura 8. Produção de sideróforo confirmada pela coloração alaranjada
Figura 9. Isolados inoculados em meio semi-sólido livre de nitrogênio com possível potencial
para fixar nitrogênio de forma assimbiótica63
Figura 10. Análise granulométrica do perfil de Terra Preta da Amazônia e solo adjacente do
Pará
Figura 11. Concentração de fósforo (mg.dm ⁻³) do perfil de Terra Preta da Amazônia e solo
adjacente do Pará
Figura 12. Quantificação da glomalina facilmente extraível por Bradford e da glomalina total
nos diferentes horizontes em um perfil de Terra Preta da Amazônia do Pará
Figura 13. Contagem da população bacteriana cultivável de amostras de Terra Preta da
Amazônia do Pará
Figura 14. Caracterização fenotípica dos isolados bacterianos obtidos das amostras do
horizonte A de Terra Preta da Amazônia do Pará72
Figura 15. Caracterização fenotípica dos isolados bacterianos obtidos das amostras do
horizonte B de Terra Preta da Amazônia do Pará73
Figura 16. Caracterização fenotípica dos isolados bacterianos obtidos das amostras do
horizonte C de Terra Preta da Amazônia do Pará74
Figura 17. Frequência da solubilização de fosfato de cálcio dos isolados obtidos do horizonte
A de um perfil de Terra Preta da Amazônia do Pará74
Figura 18. Frequência da solubilização de fosfato de cálcio dos isolados obtidos do horizonte
B de um perfil de Terra Preta da Amazônia do Pará76

Figura 19. Frequência da solubilização de fosfato de cálcio dos isolados obtidos no horizonte C de um perfil de Terra Preta da Amazônia do Pará......77 Figura 20. Frequência da produção de AIA na presença de L-triptofano (5Mm) dos isolados obtidos do horizonte A de um perfil de Terra Preta da Amazônia do Pará......78 Figura 21. Frequência da produção de AIA na presença de L-triptofano (5Mm) dos isolados Figura 22. Frequência da produção de AIA na presença de L-triptofano (5Mm) dos isolados obtidos do horizonte C de um perfil de Terra Preta da Amazônia do Pará......81 Figura 23. Frequência de isolados que apresentaram capacidade de fixar nitrogênio no Figura 24. Frequência de isolados que apresentaram capacidade de fixar nitrogênio no Figura 25. Frequência de isolados que apresentaram capacidade de fixar nitrogênio no Figura 26. Árvore filogenética Neighbor-joining de sequências 16S rRNA de isolados obtidos de um perfil de Terra Preta da Amazônia, no sítio Jabuti, Pará, Brasil......90

Capítulo III – METAGENÔMICA DE UM PERFIL DE TERRA PRETA DA AMAZÔNIA E SEUS ATRIBUTOS FUNCIONAIS

Figura 1. Pipeline para a obtenção dos dados metagenômico das amostras de TPA e solo
adjacente e controles aplicados durante as etapas113
Figura 2. Etapas para a construção das bibliotecas metagenômicas (shotgun)114
Figura 3. Classificação taxonômica dos reads obtidos da Terra da Amazônia e solos adjacente
do Pará ao nível de filo119
Figura 4. Classificação taxonômica dos reads obtidos da Terra da Amazônia e solos adjacente
do Pará ao nível de classe
Figura 5. Classificação taxonômica dos reads obtidos da Terra da Amazônia e solos adjacente
do Pará ao nível de ordem
Figura 6. Classificação taxonômica dos reads obtidos da Terra da Amazônia e solos adjacente
do Pará ao nível de família121
Figura 7. Classificação taxonômica dos reads obtidos da Terra da Amazônia e solos adjacente
do Pará ao nível de gênero122
Figura 8. Classificação dos reads obtidos da Terra da Amazônia e solos adjacente do Pará ao
nível de espécie

Figura 9. Árvore filogenética (máxima verossimilhança) dos bins obtidos na biblioteca do
horizonte A de Terra Preta da Amazônia (TPHA) do Pará 125
Figura 10. Árvore filogenética (máxima verossimilhança) dos bins obtidos na biblioteca do
horizonte B de Terra Preta da Amazônia (TPHB) do Pará 126
Figura 11. Árvore filogenética (máxima verossimilhança) dos bins obtidos na biblioteca do
horizonte C de Terra Preta da Amazônia (TPHC) do Pará 127
Figura 12. Árvore filogenética (máxima verossimilhança) dos bins obtidos na biblioteca do
solo adjacente (ADJ) do Pará 128
Figura 13. Mapa metabólico microbiano anotado na biblioteca do horizonte A de Terra Preta
da Amazônia (TPAHA) do Pará 129
Figura 14. Mapa metabólico microbiano anotado na biblioteca horizonte B de Terra Preta da
Amazônia (TPAHB) do Pará 131
Figura 15. Mapa metabólico microbiano anotado na biblioteca horizonte C de Terra Preta da
Amazônia (TPAHC) do Pará 133
Figura 16. Mapa metabólico microbiano anotado na biblioteca do solo adjacente (ADJ) do Pará

LISTA DE TABELAS

Capítulo II – ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS
PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS ORIUNDAS DE UM PERFIL DE
TERRA PRETA DA AMAZÔNIA
Tabela 1. Primers e condições de ciclagem utilizados para amplificar os genes alvo qPCR64
Tabela 2. Caracterização química de um perfil de Terra Preta da Amazônia e solo adjacente do
Pará
Tabela 3. Isolados solubilizadores de fosfato de cálcio obtidos do horizonte A de um perfil de
Terra Preta da Amazônia do Pará75
Tabela 4. Isolados solubilizadores de fosfato de cálcio obtidos do horizonte B de um perfil de
Terra Preta da Amazônia do Pará76
Tabela 5. Isolados solubilizadores de fosfato de cálcio obtidos do horizonte B de um perfil de
Terra Preta da Amazônia do Pará77
Tabela 6. Isolados produtores de AIA obtidos do horizonte A de um perfil de Terra Preta da
Amazônia do Pará79
Tabela 7. Isolados produtores de AIA obtidos do horizonte B de um perfil de Terra Preta da
Amazônia do Pará80
Tabela 8. Isolados produtores de AIA obtidos do horizonte C de um perfil de Terra Preta da
Amazônia do Pará
Tabela 9. Mecanismos de promoção de crescimento de plantas dos isolados prospectados no
perfil de Terra Preta da Amazônia
Tabela 10. Identificação de isolados obtidos de um perfil de Terra Preta da Amazônia, no sítio
Jabuti, Pará, Brasil, com base nas sequências do EzBioCloud

Capítulo III – METAGENÔMICA DE UM PERFIL DE TERRA PRETA DA AMAZÔNIA E SEUS ATRIBUTOS FUNCIONAIS

Tabela 1. Concentração de DNA total extraído a partir de 0,5 g das amostras de T	Cerra Preta da
Amazônia e solo adjacente do Pará	
Tabela 2. Concentração de DNA total extraído a partir de 10 g das amostras de T	'erra Preta da
Amazônia e solo adjacente do Pará	
Tabela 3 . Critério para a análise de qualidade das sequências	
Tabela 4. Resumo dos parâmetros de qualidade para as sequências o	obtidas após
sequenciamento de bibliotecas de Terra Preta da Amazônia e solo adjacente do Pa	ará117

Tabela 5. Resumo da base de dados válida utilizada para bioinformática de Terra Preta
Amazônia e solo adjacente do Pará1
Tabela 6. Resumo dos resultados do agrupamento dos contigs (binning) em genom
individuais putativos de Terra Preta da Amazônia e solo adjacente do Pará 12
Tabela 7. Número total de bins e bins filtrados (cobertura < 50 % e contaminação > 15 9
obtidos de Terra Preta da Amazônia e solo adjacente do Pará12

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	21
1.1 Hipóteses	22
1.2 Objetivos	22
1.2.1 Objetivo Geral	22
1.2.2 Objetivos Específicos	22
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1 A Amazônia Legal	24
2.2 Terra Preta da Amazônia	24
2.3 Diversidade microbiana na terra preta da amazônia	25
2.4 Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (BPCP)	27
2.5 Mecanismos de ação das Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas	
2.6 Avaliação da atividade microbiana no solo	31
2.7 Abordagens ômicas para acessar as comunidades microbianas do solo	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
3 ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE	BACTÉRIAS
PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS ORIUNDAS DE UN	1 PERFIL DE
TERRA PRETA DA AMAZÔNIA	
Resumo	48
Abstract	49
3.1 INTRODUÇÃO	50
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	53
3.2.1 Área de estudo e coleta de solo	53
3.2.2 Caracterização físico-química do solo	55
3.2.3 Glomalina no solo	56
3.2.4 Isolamento de bactérias com potencial biotecnológico	57
3.2.5 Caracterização fenotípica e armazenamento dos isolados bacterianos	58
3.2.6 Mecanismos de promoção de crescimento de plantas	59
3.2.6.1 Solubilização de fosfato de cálcio	59
3.2.6.2 Produção de ácido indol-acético (AIA)	60
3.2.6.3 Produção de sideróforos	61
3.2.6.4 Fixação biológica de nitrogênio em meio semissólido	62
3.2.7 Extração de DNA dos isolados	63

3.2.8 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)	64
3.2.9 Amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA	64
3.2.10 Análise estatística e interpretação dos resultados	65
3.3 RESULTADOS	66
3.3.1 Atributos físicos e químicos do solo	66
3.3.2 Glomalina no solo	69
3.3.3 Isolamento e contagem das unidades formadoras de colônias das amostras do perfil	de
solo de Terra Preta da Amazônia do Pará	71
3.3.4 Caracterização fenotípica e armazenamento dos isolados bacterianos	71
3.3.5 Mecanismos de promoção de crescimento de plantas	74
3.3.5.1 Solubilização de fosfato de cálcio	74
3.3.5.2 Produção de ácido indol acético (AIA)	78
3.3.5.3 Produção de sideróforos	82
3.3.5.4 Fixação biológica de nitrogênio em meio semissólido	83
3.3.7 Sequenciamento do gene 16S rRNA dos isolados bacterianos de Terra Preta da Amazô	nia
	87
3.4 DISCUSSÃO	91
3.4.1 Atributos físicos e químicos do solo	91
3.4.2 Glomalina e prospecção de bactérias promotoras de crescimento de plantas	93
3.5 CONCLUSÕES	96
3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
4 METAGENÔMICA DE UM PERFIL DE TERRA PRETA DA AMAZÔNIA E SE	US
ATRIBUTOS FUNCIONAIS 1	07
Resumo1	07
Abstract 1	08
4.1 INTRODUÇÃO 1	09
4.2 MATERIAL E MÉTODOS 1	11
4.2.1 Extração de DNA da Terra Preta da Amazônia e solo adjacente do Pará 1	11
4.2.2 Preparo das bibliotecas de sequenciamento (shotgun)1	13
4.2.3 Análises de bioinformática 1	15
4.3 RESULTADOS 1	17
4.3.1 Sequenciamento (shotgun) 1	17
4.3.2 Classificação taxonômica 1	18
4.3.3 Metabolismo microbiano 1	28

4.4 DISCUSSÃO	137
4.5 CONCLUSÕES	142
4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	143
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	151
APÊNDICES	152

1 INTRODUÇÃO GERAL

A floresta Amazônica apresenta uma vasta extensão distribuída por nove países da América do Sul, dentre eles o Brasil. No território brasileiro, a floresta encontra-se concentrada em sua maior parte nos estados da região Norte, com exceção do Maranhão e Mato Grosso pertencentes às regiões Nordeste e Centro-Oeste, respectivamente. A Amazônia apresenta uma enorme riqueza natural incluindo a madeira, o látex, a castanha e outros frutos provenientes das árvores, que têm sido alvo de grandes eventos de desmatamento; os garimpos para atividade mineradora, que têm ocasionado a contaminação e desapropriação irregular de terras indígenas. Além disso, os peixes e outras espécies que habitam a maior bacia hidrográfica do mundo fazem parte desse bioma tão ameaçado pelas atividades humanas inapropriadas.

Os povos indígenas foram os primeiros habitantes desse bioma de tão grande diversidade. É de suma importância ressaltar as contribuições deixadas pelos povos indígenas na região amazônica, por meio da pesca, agricultura de subsistência e exploração de forma adequada a fim de atender apenas às necessidades da tribo de acordo com sua demanda e sem explorar de maneira excessiva. Desta forma, os indígenas contribuíram não apenas para a manutenção dos recursos naturais, como também para a formação dos solos antropogênicos da Amazônia, também chamados de Terra Preta da Amazônia ou Terra Preta de Índio. Esses solos são encontrados não apenas no estado do Amazonas, mas em toda a Amazônia Legal, que está dividida na porção Ocidental e Oriental. Algumas manchas de Terra Preta estão presentes em outros estados pertencentes à Amazônia Oriental, como por exemplo, o Pará.

A formação da Terra Preta da Amazônia teve origem há muitos anos, principalmente, pela ação dos povos indígenas, tendo sua formação derivada principalmente de materiais orgânicos e inorgânicos. A coloração escura originou o nome desses solos que apresentam elevado teor de matéria orgânica e boa fertilidade. De modo geral, os solos da região amazônica apresentam baixa fertilidade, baixo teor de matéria orgânica e pH ácido, sendo então contrastantes com a Terra Preta de Índio. Esses fatos têm despertado o interesse de muitos pesquisadores que buscam entender a composição mineralógica desses solos, sua química, fertilidade e atividade microbiana.

A elevada disponibilidade de nutrientes nos solos antropogênicos da Amazônia favorece o aumento da diversidade e abundância das comunidades microbianas. A presença de biocarvão nesses solos contribui para melhorar não só os atributos físicos e químicos, mas também serve de abrigo para fungos e bactérias devido a sua superfície porosa. Essa diversidade e abundância de micro-organismos nos solos pode ser avaliada por meio de diferentes técnicas, a depender do objetivo do trabalho.

As abordagens dependentes de cultivo têm sido utilizadas principalmente para a obtenção de micro-organismos capazes de promover o crescimento vegetal e atuar na supressão de doenças. Enquanto as técnicas moleculares no estudo das comunidades microbianas em diferentes solos têm se tornado cada vez mais frequentes devido a sua eficiência.

Desta forma, a extração do DNA total do solo permite estudar e conhecer as comunidades microbianas e suas respectivas funções exercidas no solo, através da metagenômica. Mas isso só é possível com a ajuda de uma ferramenta muito importante, a bioinformática, que nos permite também a construção de vias metabólicas, enzimas e genes envolvidos na ciclagem de nutrientes a partir dos dados obtidos da metagenômica. Por isso, a utilização de técnicas moleculares no estudo da Terra Preta da Amazônia tem se mostrado promissora na descoberta de novos produtos com potencial biotecnológico.

1.1 Hipóteses

- Os solos da Terra Preta da Amazônia abrigam micro-organismos com elevado potencial e ampla diversidade biotecnológica, capazes de promover o crescimento de plantas através de mecanismos como a solubilização de fosfato, a fixação biológica de nitrogênio, produção de AIA, ACC deaminase e sideróforos;
- A Terra Preta da Amazônia é habitada por uma ampla diversidade de micro-organismos que secretam diferentes enzimas no solo e atuam em vias metabólicas distintas, relacionadas aos ciclos biogeoquímicos.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a diversidade microbiana, processos metabólicos e transformações biogeoquímicas relacionados à manutenção da fertilidade e sustentabilidade da Terra Preta da Amazônia (TPA) e seu potencial biotecnológico.

1.2.2 Objetivos Específicos

• Isolar e caracterizar morfologicamente, e identificar micro-organismos de Terra Preta da Amazônia;

- Avaliar o potencial biotecnológico (*in vitro*) dos isolados obtidos de TPA na promoção de crescimento de plantas;
- Determinar a diversidade microbiana da TPA por meio do sequenciamento do DNA metagenômico (técnica de *shotgun*);
- Determinar a diversidade metabólica e genes ativos na TPA através do sequenciamento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Amazônia Legal

A floresta Amazônica está localizada na América do Sul, sendo distribuída ao longo de nove países e apresenta uma extensão de aproximadamente 7 milhões de km². O Brasil, por sua vez, detém a maior parte (60 %) desse bioma. Os 40 % restantes estão distribuídos entre Peru (maior parte), Bolívia, Equador, Colômbia, Guiana, Guiana Francesa, Suriname e Venezuela (DIVINO; McALEER, 2009). No território brasileiro, a floresta Amazônica ocupa uma área de aproximadamente 5,2 milhões de km² (PEREIRA et al., 2022). Essa vasta extensão está distribuída entre os estados da Amazônia, Acre, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, oeste do Maranhão e norte do Mato Grosso compondo a Amazônia legal (FERREIRA; COELHO, 2015).

O termo Amazônia Legal surgiu em 1953 com o intuito de melhorar o desenvolvimento da região, sendo a Amazônia dividida em Oriental e Ocidental. A Amazônia Ocidental compreende aos estados do Acre, Amazonas, Roraima e Rondônia e a Amazônia Oriental é composta pelos estados do Pará, Maranhão, Amapá, Tocantins e Mato Grosso (SUDAM, 2020). A região amazônica, Amazônia legal brasileira (ABL), compreende uma ampla diversidade de classes de solos, onde aproximadamente 50 % são habitados por povos indígenas que vivem basicamente da agricultura de subsistência. Dentre as classes de solo estão: Latossolos, Argissolos, Plintossolos, Espodossolos, Luvissolos, Cambissolos, Gleissolos, Nitossolos, Neossolos, Planossolos e Chernossolos. Essa diversidade pode ser justificada pela ação dos fatores de formação do solo. Entretanto, os solos dessa região, geralmente, são caracterizados pela acidez elevada, baixo teor de macro e micronutrientes, densidade elevada e susceptibilidade à erosão (DO VALE JÚNIOR et al., 2011).

Os povos indígenas, por meio das suas práticas conservacionistas e costumes, como a utilização de fogueiras para cozinhar, agricultura de subsistência, depósito de resíduo orgânicos e biocarvão no solo têm grande participação no desenvolvimento dos solos da região amazônica, dando origem aos solos antropogênicos, também conhecidos como Terra Preta da Amazônia (KERN; KÄMPF, 2005).

2.2 Terra Preta da Amazônia

A Terra Preta da Amazônia, também conhecida como Terra Preta de Índio, originou-se a partir da influência de processos antropogênicos. No período pré-colombiano, os habitantes recém-chegados ao Brasil, mais especificamente na região amazônica, juntamente com os povos nativos e escravizados tiveram um importante papel para a formação desses solos (LIMA et al., 2002).

A formação desses solos deriva de um processo pedogenético caracterizado pelo seu escurecimento (podendo a coloração variar entre preto e castanho), denominado melanização, sendo assim, um indicativo do elevado conteúdo de matéria orgânica. Além disso, as ações humanas, por meio da adição e remoção de materiais orgânicos e inorgânicos, contribuíram para a formação da Terra Preta da Amazônia. Alguns exemplos da contribuição das atividades antrópicas para a formação desse solo são: achados de cerâmica e intensificação do uso da terra a partir da agricultura de subsistência (MACEDO et al., 2017).

Os solos da Amazônia são caracterizados pelo baixo conteúdo de matéria orgânica, pH ácido e baixa fertilidade, devido a ação intensa dos fatores que influenciam no intemperismo. Dentre os solos existentes na região, a TPA destaca-se devido a sua alta fertilidade natural, capacidade de troca de cátions e grande quantidade de matéria orgânica. Esta matéria orgânica, além de ser responsável pela coloração escura do solo, melhora sua estrutura, capacidade de infiltração e retenção de água (SOUZA et al., 2016). Estudos têm mostrado que o elevado teor de matéria orgânica nos solos antrópicos da Amazônia contribui para o enriquecimento desses solos com carbono orgânico total, nitrogênio (N), magnésio (Mg), potássio (K), zinco (Zn), manganês (Mn) e ferro (Fe), considerados nutrientes essenciais para o desenvolvimento das plantas (KERN et al., 2019; PAGANO et al., 2016).

A disponibilidade de nutrientes na TPA, quando comparada aos demais solos da região, apresenta resultados contrastantes e tem sido atribuída ao tipo de resíduo, bem como, ao tempo de deposição e decomposição desses resíduos. Alguns nutrientes, como por exemplo, cálcio e fósforo, são adicionados ao solo a partir da decomposição de ossos, lixo doméstico e resíduos de culturas (BARBOSA et al., 2020; MAEZUMI et al., 2018). O biocarvão e as cinzas estão presentes em grandes quantidades na Terra Preta da Amazônia, devido à queima de lenha e outros materiais orgânicos e inorgânicos, prática muito comum entre a população indígena, que no passado habitava a região. Devido a elevada disponibilidade de nutrientes e porosidade da matéria orgânica carbonizada, alguns trabalhos têm demonstrado um aumento na abundância e diversidade microbiana na TPA (LIMA; MUNIZ; DUMONT, 2014; WOICIECHOWSKI et al., 2018).

2.3 Diversidade microbiana na terra preta da amazônia

A variedade de nutrientes e elevada fertilidade da Terra Preta da Amazônia contribui para o aumento na riqueza de espécies e diversidade microbiana. Os fungos, de modo geral, atuam na decomposição da matéria orgânica lignificada, enquanto as arqueias e bactérias secretam enzimas e produzem mecanismos capazes de melhorar o desenvolvimento das plantas através da solubilização de nutrientes e produção de fitohormônios (NAVARRETE et al., 2010). Para acessar esses micro-organismos, são utilizadas técnicas dependentes e independentes de cultivo (TAKETANI et al., 2013).

A presença de biocarvão na TPA melhora as características físicas do solo como, por exemplo, estrutura, porosidade, umidade e capacidade de retenção de água (GLASER; BIRK, 2012; PANDEY et al., 2020; SOUZA et al., 2016). Estes fatores contribuem para o aumento da atividade microbiana. Os fungos, por sua vez, tendem a colonizar as superfícies das partículas da matéria orgânica carbonizada e projetar suas hifas para o interior dos poros, facilitando, assim, a agregação. Os estudos voltados para a diversidade funcional de fungos ainda são muito incipientes, tendo demonstrado a presença de organismos pertencentes a diferentes filos na Terra Preta da Amazônia, tais como: Basidiomycota, Ascomycota, Chytridiomycota e Glomeromycota (LUCHETA et al., 2016). Desta forma, a floresta amazônica em sua constante resiliência é uma das grandes responsáveis pela manutenção da diversidade de fungos, através de processos como a ciclagem de nutrientes que ocorrem em grandes proporções nos solos da região, que em conjunto com outros micro-organismos são primordiais para a renovação desse ecossistema (LUCHETA et al., 2017).

A TPA é considerada um ambiente propício para o desenvolvimento de diferentes comunidades bacterianas, que participam ativamente da ciclagem de nutrientes e apresentam grande potencial biotecnológico, atuando também na síntese de compostos. No solo, as bactérias exercem diversas funções, dentre elas podemos destacar a fixação biológica de nitrogênio e a solubilização de fosfato. Na Terra Preta da Amazônia, grupos com potencial biotecnológico têm se destacado, como, por exemplo: *Bacillus, Streptomyces, Lactobacillus e Microbacterium* (ABEGG et al., 2016). Além disso, esses micro-organismos apresentam elevada sensibilidade e respondem a diferentes estímulos, que podem ser desde uma comunicação com plantas de diferentes espécies, secretando assim diferentes compostos; ou uma mudança no manejo ou tipo de solo, que consequentemente altera toda a dinâmica de nutrientes e absorção de água, afetando também os processos biogeoquímicos (SOUZA et al., 2018).

As arqueas são micro-organismos de difícil cultivo, capazes de habitar ambientes inóspitos e em condições extremas, mas também se encontram presente nos ambientes agrícolas participando ativamente do ciclo do metano e nitrogênio (VENTURINI et al., 2022). Além dos atributos físicos e químicos do solo, as comunidades de arquéias podem ser fortemente

influenciadas pela mudança de uso da terra, profundidade e o tipo de solo. Dentre o domínio Archaea, o principal filo observado nos solos é o Crenarchaeota (GROSSMAN et al., 2010). Na Terra Preta da Amazônia a baixa diversidade de arquéias foi associada ao elevado pH do solo, visto que, esses organismos têm como habitat preferencial solos ácidos (TAKETANI; TSAI, 2010).

Alguns trabalhos com a TPA têm buscado entender por meio de diferentes técnicas, como funciona a diversidade microbiana, quem são os principais grupos de organismos presentes em maior quantidade, como esses grupos se arranjam filogeneticamente, quais as funções desses micro-organismos no solo e suas principais vias metabólicas (NAVARRETE et al., 2010; NAVARRETE et al., 2013; O'NEILL et al., 2009). A partir disso, é possível desenvolver produtos com potencial biotecnológico e potencializar a agricultura nos solos antrópicos da Amazônia (BROSSI et al., 2014; KIM et al., 2007).

2.4 Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (BPCP)

A rizosfera é definida como a zona ao redor das raízes das plantas, onde ocorre a deposição de ácidos orgânicos, carboidratos, aminoácidos e metabólitos secundários, que favorecem a atividade de inúmeros grupos microbianos responsáveis por desempenhar diferentes funções no solo e auxiliam o crescimento das plantas (HAKIM et al., 2021). Os exsudatos são compostos de baixo peso molecular liberados pelas raízes das plantas, responsáveis por modular a atividade microbiana no solo, favorecendo o desenvolvimento de bactérias promotoras de crescimento de plantas (HASSAN; McINROY; KLOEPPER, 2019). A interação entre microrganismos e plantas se dá através de diferentes sinais que induzem as bactérias a colonizar as células vegetais e como consequência ocorre o estímulo do crescimento vegetal, disponibilidade de nutrientes, proteção contra o ataque de patógenos e presença de elementos tóxicos (SARFRAZ et al., 2019).

As BPCP podem ser isoladas do solo rizosférico, do solo não rizosférico e do interior das plantas, sendo denominadas de rizobactérias, bactérias de vida livre e bactérias endofíticas, respectivamente (EMAMI et al., 2020). Esses micro-organismos têm se destacado devido aos efeitos benéficos proporcionados ao solo, às plantas e, consequente aumento na produtividade das culturas. Os filos Firmicute e Proteobacteria são dominantes entre as BPCP, sendo *Burkholderia, Enterobacter, Pseudomonas, Acinetobacter e Bacillus* alguns dos gêneros representantes (RAMAKRISHNA; YADAV; LI, 2019).

Singh et al. (2022) avaliaram a importância das cepas de *Pseudomona*s spp., bem como sua utilização combinada com outros micro-organismos, confirmando as evidências das

vantagens proporcionadas pelos consórcios microbianos, que consistem na utilização de dois ou mais micro-organismos para promover o crescimento das plantas.

Para melhorar o crescimento das plantas, as BPCP atuam na disponibilidade de macronutrientes e micronutrientes como, por exemplo, nitrogênio (N), fósforo (P), potássio, cálcio (Ca), ferro, molibdênio (Mo), zinco, e boro (Bo), respectivamente (AERON et al., 2019). A liberação de ácidos orgânicos contribui para a solubilização de nutrientes além de reduzir o pH do solo. Algumas BPCP podem estabelecer uma relação simbiótica ou não com as plantas, onde ocorre, por exemplo, a fixação biológica de nitrogênio (REZENDE et al., 2021), além de promover o crescimento das plantas através da produção de fitohormônios (GAETE; MANDAKOVIC; GONZÁLEZ, 2020).

2.5 Mecanismos de ação das Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas

As BPCP podem produzir mais de um mecanismo, simultaneamente, adaptando-se às condições ambientais, melhorando a absorção de água e nutrientes e conferindo às plantas maior tolerância aos estresses biótico e abiótico (CHOUDHARY et al., 2016). As BPCP tendem a ter genes de resistência e podem atuar por meio de mecanismos diretos, que são responsáveis por regular os níveis de hormônios vegetais e auxiliar na aquisição de recursos por meio da produção fitohormônios, sideróforos, fixação biológica de nitrogênio e solubilização de fosfato; e de mecanismos indiretos, que atuam inibindo o ataque de patógenos através da indução a resistência sistêmica, ACC deaminase e antibiose (OLANREWAJU; GLICK; BABALOLA, 2017).

O nitrogênio é um elemento essencial na composição de proteínas e nucleotídeos, sendo assim, o nutriente requerido em maior quantidade pelas culturas, podendo ser absorvido na forma de nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-) ou amônio (NH_4^+). Para suprir a demanda das plantas, grandes quantidades de N são aplicadas nos solos através de adubos químicos nitrogenado e o grande desafio da agricultura sustentável é reduzir a aplicação desses adubos bem como suas perdas por lixiviação, desnitrificação e volatilização (MOREAU et al., 2019). A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um dos processos essenciais para as plantas de alto gasto energético, ficando atrás apenas da fotossíntese (CARVALHO et al., 2019).

Embora seja abundante na atmosfera, o nitrogênio atmosférico (N_2) não pode ser assimilado pelas plantas. Desta forma, as bactérias fixadoras de nitrogênio são uma alternativa para substituir a adubação mineral, uma vez que são capazes de converter o N_2 em amônia, processo catalisado pela enzima nitrogenase (WONGDEE et al., 2018). Os micro-organismos diazotróficos, responsáveis pela FBN, carregam genes que codificam a enzima nitrogenase e são responsáveis pela fixação de nitrogênio (*nif*) e regulação da concentração de oxigênio (*fix*). Após colonizar os tecidos internos das plantas, as BPCP criam um ambiente propício para a FBN através de condições limitantes de oxigênio ideal para ativação da nitrogenase (MAHMUD et al., 2020).

O fósforo é um elemento essencial para os seres vivos, pois atua como componente estrutural de fosfolípidos, ácidos nucléicos, fosfoproteínas e coenzimas, além de participar de processos como formação da membrana plasmática, fotossíntese e respiração (ETESAMI; JEONG; GLICK, 2021). Embora esteja abundante na crosta terrestre, o P encontra-se na forma de compostos insolúveis, sendo necessário o auxílio de bactérias promotoras de crescimento capazes de solubilizar o P inorgânico e disponibilizar para a planta na forma de ânions (H₂PO₄⁻, HPO₄²⁻, PO₄³⁻) Bargaz et al. (2021).

As bactérias solubilizadoras de fósforo disponibilizam os fosfatos inorgânicos secretando ácidos orgânicos, como, ácido cítrico e ácido glucônico contendo grupamentos carboxila (COOH) e hidroxila (OH). Os ácidos orgânicos são capazes de quelar os cátions ligados aos fosfatos, reduzem o pH do solo, complexam os íons metálicos e deslocam o P para o local de adsorção, para, assim, transformar o fósforo insolúvel em solúvel (RANA et al., 2020). Outro mecanismo de ação das bactérias para solubilizar fosfatos orgânicos consiste na síntese de fosfatases, como as fitases e nucleases que agem através do processo de hidrólise de ésteres fosfóricos e consequente liberação do grupamento fosfato. Além de disponibilizar nutrientes, a inoculação de BPCP traz como benefícios secundários o aumento do peso seco da parte aérea, produtividade e desenvolvimento radicular, o que contribui também para melhorar a absorção de água e outros nutrientes (RAWAT et al., 2020).

O ferro (Fe) é um micronutriente essencial para o desenvolvimento das plantas e participa de processos como síntese de DNA e hormônios, fotossíntese, respiração e cofator enzimático. Em condições aeróbicas o Fe^{2+} é oxidado a Fe^{3+} , dando origem a compostos insolúveis (ZHANG et al., 2019). Os sideróforos são compostos de baixo peso molecular que apresentam afinidade por ferro quelando esse elemento. Existem vários tipos de sideróforos produzidos por diferentes micro-organismos. Em condições limitantes de ferro essas moléculas são responsáveis por solubilizar o ferro proveniente de fontes minerais e de compostos orgânicos (OLEŃSKA et al., 2020).

Os complexos formados entre compostos férricos (Fe³⁺) e sideróforos são do tipo 1:1, de modo que as BPCP captam o complexo e dentro da membrana celular, o Fe³⁺ é reduzido a Fe²⁺ e em seguida liberado do sideróforos para dentro da célula (KRAMER et al., 2020). A formação desse complexo inibe o ataque de patógenos, uma vez que esses micro-organismos também precisam de Fe para sua nutrição. Os sideróforos microbianos podem formar complexos com metais pesados, como, por exemplo, Pb, Cd, Al, Ga, Cu e Zn, sendo utilizados como agente quelantes desses metais, regulando assim, a disponibilidade de ferro e aliviando a toxicidade por metais pesados (HUO et al., 2021).

Os fitohormônios são sinalizadores químicos que influenciam no crescimento, desenvolvimento, diferenciação e abertura dos estômatos, além de auxiliar as plantas a resistir a flutuações ambientais (POVEDA; GONZÁLEZ-ANDRÉS, 2021). Os principais hormônios vegetais produzidos por micro-organismos e responsáveis por auxiliar no desenvolvimento das plantas são: ácido jasmônico, giberelinas, ácido salicílico, etileno, estrigolactonas, ácidos abscísico, brassinosteróides, citocininas e auxinas. Dentre esses, as citocininas, giberelinas e auxinas são os fitohormônios mais produzidos pelas BPCP, sendo as auxinas as mais estudadas (KHAN et al., 2020).

O ácido indol acético (AIA) é um tipo de auxina produzida por BPCP responsável por participar de importantes processos fisiológicos, como crescimento e desenvolvimento vegetal e ativação dos mecanismos de defesa sob condições de estresse (DUCA; GLICK, 2020). As BPCP são capazes de regular a concentração interna de AIA nas plantas, além de proporcionar o aumento no crescimento radicular e consequentemente aumentar a absorção de nutrientes (LOBO et al., 2019).

O etileno é um hormônio vegetal essencial para o desenvolvimento das plantas (NAIK et al., 2019). Em condições limitantes, tais como, solos salinos, contaminados com metais pesados, ataque de patógenos e estresse hídrico, os níveis desse fitohormônio aumentam e, como consequência, ocorre a redução do crescimento das plantas, desenvolvimento das raízes e envelhecimento precoce (BHAT et al., 2020). A produção de etileno pode ser regulada por BPCP (KAUSHAL 2020). Isso porque alguns desses micro-organismos são capazes de metabolizar o ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) que é o precursor do etileno, convertendo-o em amônia e α -cetobutirato (CHANDWANI; AMARESAN, 2022). A redução nos níveis de etileno, além de contribuir para o crescimento das plantas, confere aos vegetais resistência aos fatores bióticos e abióticos (KUMAR et al., 2020).

Sofy et al. (2021) isolaram bactérias endofíticas do grão-de-bico para posteriormente inocular em plantas de ervilha. Os isolados foram testados quanto a produção de AIA, solubilização de fosfato, FBN e produção de ACC deaminase. Após os testes *in vitro*, as bactérias *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas fluorescens*, foram selecionadas para a produção do inóculo. Essas bactérias apresentaram os melhores resultados quanto a estimulação do crescimento vegetal, além de tolerar diferentes concentrações de sais, se mostrando capazes de aliviar o estresse salino nas plantas.

2.6 Avaliação da atividade microbiana no solo

Os micro-organismos do solo podem ser acessados por técnicas dependentes e independentes de cultivo. As técnicas dependentes de cultivo consistem na utilização de meios de cultura geral ou mais específicos para o crescimento de bactérias e fungos (ROCHA et al., 2019; SCHÜTZ et al., 2019). A partir do isolamento e caracterização desses micro-organismos é possível testar mecanismos que promovam o crescimento de plantas, como, por exemplo, solubilização de fosfato, fixação biológica de nitrogênio (atividade da nitrogenase), produção de ácido indol-acético (AIA), ácido-1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) deaminase, biofilme e sideróforos (ABEDINZADEH; ETESAMI; ALIKHANI, 2019; MOSA et al., 2016; TURAN et al., 2019).

A glomalina é uma glicoproteína secretada no solo por fungos micorrízicos arbusculares (FMA), pertencentes ao filo Glomeromycota, único grupo de fungos capaz de produzi-la. Os FMA liberam a glomalina no solo apenas em dois momentos: durante o processo de renovação das hifas e após a morte do fungo (MAGURNO et al., 2019). Após ser depositada no solo a glomalina pode representar aproximadamente 5 % do carbono e nitrogênio do solo. Em sua composição, a glomalina apresenta uma porcentagem representativa de elementos essenciais, cerca de 36 - 59 % de C; 33 - 49 % de oxigênio (O); 0,8 - 8,8 % de Fe; 4 - 6 % de hidrogênio (H); 3 - 5 % de N e 0,03 - 0,1 % de P (SINGH; SINGH; TRIPATHI, 2012).

A relação simbiótica entre FMA e planta é uma das mais antigas, onde o fungo é capaz de sequestrar mais de 70 % de C da planta para utilizar como fonte de energia. A maior parte desse carbono obtido das plantas é utilizado para a produção de glomalina, o que justifica os elevados teores de C na composição dessa glicoproteína (PARIHAR et al., 2020). A glomalina está associada à estabilidade de agregados e, consequentemente, à disponibilidade de nutrientes, água, aeração e drenagem do solo (IRVING et al., 2021). A presença de FMA e glomalina no solo têm sido utilizada como indicador da qualidade do solo em áreas de desertificação, em condições de estresse (HAMMER; RILLING, 2011), em áreas com elevados teores de metais pesados (JIA et al., 2016), em terras agrícolas (WANG et al., 2015), em áreas de florestas e recuperação de áreas degradadas (VASCONCELLOS et al., 2013).

O método de Bradford utilizado para quantificar proteínas é o mais empregado para quantificar a glomalina no solo. A análise tem como princípio a ligação das proteínas com um corante responsável pela mudança de cor do vermelho para azul. A partir da mudança de cor

do extrato após reagir com o corante e a curva composta por concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA), proteína de peso molecular semente a glomalina, é possível quantificar a glomalina no solo (WRIGHT; UPADHYAYA, 1996; WRIGHT e UPADHYAYA, 1998).

A biomassa microbiana secreta diversas enzimas que participam ativamente da degradação da matéria orgânica e ciclagem de nutrientes no solo, sendo essa atividade enzimática considerada um sensível indicador da qualidade do solo. Dentre as enzimas mais avaliadas no solo estão a fosfatase ácida e alcalina (fósforo), urease (nitrogênio), arilsulfatase (enxofre), e β -glicosidase (carbono). Estas enzimas podem indicar o estresse da microbiota edáfica, principalmente devido a adição de fertilizantes em quantidades excessivas e mudanças no uso da terra (JONIEC, 2018; LINO et al., 2016; LUO et al., 2016). Além dos métodos tradicionais para análise de enzimas, a metagenômica tem sido utilizada para identificar enzimas do grupo das lipases, esterases e fosfolipases, proveniente de plantas e principalmente de micro-organismos (WU et al., 2019).

As técnicas dependentes de cultivos esbarram em limitações, como por exemplo, o fato de haver uma maior demanda de tempo utilizado para o isolamento, purificação e caracterização dos isolados e de grande parte dos micro-organismos do solo não crescerem em meios de cultura (DUARTE et al., 2019). Como alternativa para acessar esses micro-organismos são utilizadas técnicas moleculares, que consistem na extração do DNA ou RNA total do solo, e a partir disso é possível estudar a estrutura e diversidade das comunidades, bem como as funções dos mais diversos grupos microbianos (LEWIS et al., 2020). Além disso, as técnicas independentes de cultivo permitem a construção de bibliotecas genômicas e quando associadas a outras técnicas, fornecem resultados que permitem agrupar os organismos filogeneticamente e identificá-los a nível de gênero e até mesmo espécie (SCHLOTER et al., 2018).

2.7 Abordagens ômicas para acessar as comunidades microbianas do solo

As técnicas ômicas incluem estudos relacionados ao DNA (genômica), RNA (transcriptômica), proteínas (proteômica) e metabólitos (metabolômica) que permitem entender as funções desempenhadas pelos micro-organismos no solo, enquanto através do sequenciamento de nova geração, *shotgun*, ou sequenciamento de alto rendimento (segunda geração) e sequenciamento de leitura longa (terceira geração) é possível identificar os organismos que compõem as comunidades microbianas do solo (BERTOLA; FERRARINI; VISIOLI, 2021). A utilização de diferentes abordagens ômicas ou a multi-ômica permitiu avançar nos estudos a fim de compreender a estrutura e função desempenhada pelas

comunidades microbianas no solo, seu funcionamento biológico, importância no fornecimento de serviços ecossistêmicos, os benefícios da associação com as plantas e as cepas que melhor se adaptam às condições de estresse biótico e abiótico (BÜNEMANN et al., 2018).

Diante das limitações em compreender a diversidade microbiana total presente nos solos através de técnicas de cultivo, as técnicas moleculares baseadas na análise de DNA e RNA têm sido empregadas periodicamente (BOUCHEZ et al., 2016). A análise utilizada com maior frequência consiste na extração de DNA total do solo seguida da amplificação da região ITS para fungos e do gene 16S rRNA para bactérias (BALDRIAN, 2019). Após a obtenção dos produtos da PCR é possível a identificação das respectivas espécies utilizando sequenciamento de alto rendimento, através da plataforma Illumina MiSeq (WEN et al., 2017).

O sequenciamento metagenômico do tipo shotgun é um método molecular utilizado para avaliar a diversidade microbiana funcional a fim de relacionar as funções e estruturas das comunidades microbianas no solo, além de ajudar a compreender as estratégias adotas pelos micro-organismos para se adaptar às flutuações ambientais (SHARMA et al., 2022). Um perfil taxonômico é traçado a partir das sequências que são inseridas, filtradas e avaliadas em um banco de dados de referência contendo genes marcadores específicos ou genomas completos (SANDRINI et al., 2022).

Um estudo realizado por Lemos et al. (2017), utilizando solos antropogênicos da Amazônia, investigou a diversidade taxonômica e funcional microbiana por meio do sequenciamento metagenômico, shotgun, com o auxílio da plataforma Illumina MiSeq. Através dos resultados obtidos foi possível conhecer os filos mais representativos nesses solos, as proteínas funcionais mais abundantes e o potencial microbiano taxonômico e funcional bem como a presença de micro-organismos que ainda não haviam sido relatados na literatura.

2.8 Metagenômica

A metagenômica permite estudar as comunidades microbianas presentes nos mais diversos ambientes, possibilitando também a descoberta de organismos nunca antes isolados. Isso porque, aproximadamente 1% dos micro-organismos do solo são cultiváveis (ARJUN et al., 2018). Trata-se de uma abordagem independente de cultivo, baseada na extração de DNA, utilizada no estudo das comunidades microbianas a partir de uma amostra ambiental, com o objetivo de identificar suas funções no solo (MAI et al., 2014). Os estudos metagenômicos são capazes de fornecer uma ampla percepção a respeito do microbioma do solo e a ecologia microbiana global, permitindo assim a obtenção de estimativas a respeito das funções exercidas pelos micro-organismos em diferentes ecossistemas (HEMMAT-JOU et al., 2018).

A partir da extração do DNA total do solo, podem ser aplicados diferentes tipos de sequenciamento, dentre eles, destaca-se o sequenciamento de primeira ou nova geração (COLE et al., 2019). A técnica consiste na amplificação de um fragmento de DNA previamente purificado, seguida da clonagem de genes presentes no fragmento e só então esse fragmento é sequenciado. No sequenciamento por síntese, o DNA alvo recebe em suas extremidades adaptadores responsáveis por emitir fluorescência. Após o sequenciamento, a leitura é feita através de uma comparação com amostras, tidas como referência já existentes nos bancos de dados, ou no caso de ausência de amostras de referência é necessário montar uma nova sequência para leituras (KNIEF, 2014).

O Illumina MiSeq é uma plataforma relativamente nova, lançada em 2011, utilizada na técnica de sequenciamento de nova geração (QUAIL et al., 2012). A plataforma permite a obtenção de uma maior quantidade de nucleotídeos e sequências mais longas apresentando, assim, melhor custo benefício (KOZICH et al., 2013). Dentre as plataformas Illumina (HiSeq 2000, HiSeq 2500, MiSeq), a MiSeq é a mais utilizada para o sequenciamento de amplicons nos estudos voltados para a ecologia microbiana, sendo justificado pela sua capacidade de resposta em um curto espaço de tempo e obtenção de leituras mais longas da sequência conferindo, assim, elevada precisão aos resultados (WU et al., 2015). Para ser executada no sequenciador Illumina MiSeq, as bibliotecas são preparadas utilizando um kit seguindo as recomendações do fabricante Illumina e em seguida são carregadas em cartuchos de reagentes com capacidade para 300 ciclos. Por fim, para determinar a reprodutibilidade da plataforma MiSeq são utilizados como padrão os resultados obtidos após a análise de sobreposição de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU) baseada em dois experimentos (WEN et al., 2017).

A plataforma Illumina utiliza a tecnologia de sequenciamento por síntese (sequencing by synthesis -SBS), sendo que a distribuição da taxa de erros decorre principalmente de duas características: 1) a taxa de erro aumenta com a extensão do tamanho dos reads sequenciados em virtude do consumo dos reagentes na reação de sequenciamento; 2) maior taxa de erro na incorporação dos 6 primeiros nucleotídeos, devido a ligação incompleta dos primers randômicos e molécula de RNA durante o processo de síntese do DNA complementar (cDNA) Ambardar et al. (2016).

A bioinformática é utilizada como ferramenta chave na obtenção da classificação taxonômica dos organismos baseada nas OTU e/ou ASV (Amplicon Sequence Variant), bem como na diversidade microbiana (SCHLOSS, 2021). De modo que, o sequenciamento de nova geração permite a construção de bibliotecas genômicas com o auxílio da bioinformática

(ESPOSITO et al., 2016). Cada nucleotídeo recebe um corante diferente a fim de emitir fluorescência permitindo, assim, a leitura e organização na ordem correta das sequências. Para garantir o sucesso na construção de bibliotecas metagenômicas é importante levar em consideração a coleta e o acondicionamento correto das amostras de solo, a representatividade das amostras e a qualidade do DNA extraído (DANIEL, 2005).

A plataforma KBase é uma importante ferramenta de bioinformática que permite o compartilhamento, integração e análise de metadados de micro-organismos, plantas e comunidades, sendo bastante aplicada pela comunidade científica para estudos de diversidade e montagem de genomas (shotgun). Dentro da plataforma são disponibilizados "apps" para diversas análises das sequências, como qualidade, classificação taxonômica, clusterização, filogenia, montagem de genomas, entre outros (ARKIN et al., 2018).

A metagenômica tornou possível a descoberta de produtos naturais, como por exemplo, as enzimas, antibióticos e as vias de ação dos micro-organismos na degradação de xenobióticos, sendo assim, de grande importância nos estudos voltados para solos e as mais diversas áreas e biomas (KAKIRDE, PARSLEY, LILES, 2010). Esses avanços foram possíveis, graças aos valores mais acessíveis para sequenciar as amostras e uma maior quantidade de *softwares* de bioinformática gratuitos e de fácil utilização disponíveis. Embora seja uma técnica promissora, algumas lacunas ainda precisam ser desvendadas para ajudar a entender melhor a complexidade das comunidades microbianas e suas funções no solo (JANSSON; HOFMOCKEL, 2018; VESTERGAARD et al., 2017).

Venturini et al. (2022) utilizaram a metagenômica para estudar os solos da Amazônia Oriental e verificar o impacto da conversão de floresta em pastagem nas comunidades microbianas. Após a montagem dos genomas e classificação taxonômica, os autores identificaram os filos Acidobacteria, Actinobacteria e Pseudomonadota (anteriormente denominado Proteobacteria), sugerindo a presença de micro-organismos envolvidos nos ciclos dos carboidratos, nitrogênio, enxofre, metano e mercúrio.

Esses achados revelam a presença de muitos táxons ainda desconhecidos, indicando potencial para estudos futuros e a importância de conhecer o perfil das comunidades microbianas. Além disso, a investigação das comunidades microbianas através de estudos metagenômicos nos solos da Amazônia nos permitem compreender a diversidade microbiana desses solos, seu potencial funcional e rotas metabólicas a fim de obter respostas acerca do comportamento desses micro-organismos às flutuações ambientais e explorar suas possíveis aplicações biotecnológicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEDINZADEH, M.; ETESAMI, H.; ALIKHANI, H. A. Characterization of rhizosphere and endophytic bacteria from roots of maize (*Zea mays* L.) plant irrigated with wastewater with biotechnological potential in agriculture. **Biotechnology Reports**, v. 21, p. e00305, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00305>.

ABEGG, M. A.; MAGALHÃES-GUEDES, K. T.; SANTOS, A. O.; SCHWAN, R. F. Microbial community structure and chemical composition from dark earth in a native archaeological site of the lower Amazon. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, p. 1548-1554, 2016. Disponível em: <DOI: 10.5897/AJMR2016.8218>.

AERON, A.; KHARE, E.; JHA, C. K.; MEENA, V. S.; AZIZ, S. M. A.; ISLAM, M. T.; KIM, K.; MEENA, S. K.; PATTANAYAK, A.; RAJASHEKARA, H.; DUBEY, R. C.; MAURYA, B. R.; MAHESHWARI, D. K.; SARAF, M.; CHIUDHARY, M.; VERMA, R.; MEENA, H. N.; SUBBANNA, A. R. N. S.; PARIHAR, M.; SHUKLA, S.; MUTHUSAMY, G.; BANA, R. S.; BAJPAI, V. K.; HAN, Y.; RAHMAN, M.; KUMAR, D.; SINGH, N. P.; MEENA, R. K. Revisiting the plant growth-promoting rhizobacteria: lessons from the past and objectives for the future. **Archives of microbiology**, v. 202, n. 4, p. 665-676, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00203-019-01779-w.

ALVES, P. R. L. ESTRADA-BONILLA, G. A.; BINI, D.; CARDOSO, E. J. B. N. Changes in the microbial metabolism of agricultural tropical soils amended with sugarcane vinasses. **Sugar Tech**, v. 21, n. 2, p. 364-369, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s12355-019-00701-4>.

AMBARDAR, S.; GUPTA, R; TRAKROO, D.; LAL, R.; VAKHLU, J. High throughput sequencing: an overview of sequencing chemistry. **Indian journal of microbiology**, v. 56, p. 394-404, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s12088-016-0606-4>.

ARJUN, J. K; ANEESH, B. P.; KAVITHA, T.; HARIKRISHNAN, K. Characterization of a novel asparaginase from soil metagenomic libraries generated from forest soil. **Biotechnology letters**, v. 40, n. 2, p. 343-348, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s10529-017-2470-7>.

ARKIN, A. P.; COTTINGHAM, R. W.; HENRY, C. S.; HARRIS, N. L.; STEVENS, R. L.; MASLOV, S.; DEHAL, P.; WARE, D.; PEREZ, F.; CANO, S.; SNEDDON, M. W.; HENDERSON, M. L.; RIEHJ, W. J.; MURPHY-PLSON, D.; CHAN, S. Y.; KAMIMURA, R. T.; KUMARI, S.; DRAKE, M. M.; BRETTIN, T. S.; GLASS, E. M.; CHIVIAN, D.; GUNTER, D.; WESTON, D. J.; ALLEN, B. H.; BAUMOHL, J.; BEST. A. A.; BOWEN, B.; BRENNER, S. E.; BUN, C. C.; CHANDONIA, J.; CHIA, J.; COLASANTI, R.; CONRAD, N.; DAVIS, J. J.; DAVISON, B. H.; DEJONGH, M.; DEVOID, S.; DIETRICH, E.; DUBCHAK, I.; EDIRISINGHE, J. N.; FANG, G.; FARIA, J. P.; FRYBARGER, P. M.; GERLACH, W.; GERSTEIN, M.; GREINER, A.; GURTOWSKI, J.; HAUN, H. L.; HE, F.; JAIN, R.; JOACHIMIAK, M. P.; KEEGAN, K. P.; KONDO, S.; KUMAR, V.; LAND, M. L.; MEYER, F.; MILLS, M.; NOVICHKOV, P. S.; OH, T.; OLSEN, G. J.; OLSON, R.; PARRELLO, B.; PASTERNAK, S.; PEARSON, E.; POON, S. S.; PRICE, G. A.; RAMAKRISHNAN, S.; RANJAN, P.; RONALD, P. C.; SCHATZ, M. C.; SEAVER, S. M. D.; SHUKLA, M.; SUTORMIN, R. A.; SYED, M. H.; THOMASON, J.; TINTLE, N. L.; WNAG, D.; XIA, F.; YOO, H.; YOO, S.; YU, D. KBase: the United States department of
energy systems biology knowledgebase. **Nature biotechnology**, v. 36, n. 7, p. 566-569, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1038/nbt.4163.

BALDRIAN, P. The known and the unknown in soil microbial ecology. **FEMS microbiology** ecology, v. 95, n. 2, p. fiz005, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1093/femsec/fiz005>.

BARBOSA, J. Z. MOTTA, A. C, V.; CORRÊA, R. S.; MELO, V. F.; MUNIZ, A. W.; MARTINS, G. C.; SILVA, L. C. R.; TEIXEIRA, W. G.; YOUNG, S. D. BROADLEY, M. R. Elemental signatures of an Amazonian Dark Earth as result of its formation process. **Geoderma**, v. 361, p. 114085, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2019.114085>.

BARGAZ, A.; ELHAISSOUFI, W.; KHOURCHI, S.; BENMRID, B.; BORDEN, K. A.; RCHIAD, Z. Benefits of phosphate solubilizing bacteria on belowground crop performance for improved crop acquisition of phosphorus. **Microbiological Research**, v. 252, p. 126842, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126842>.

BASTIDA, F.; MORENO, J. L.; NICOLÁS, C.; HERNÁNDEZ, T.; GARCÍA, C. Soil metaproteomics: a review of an emerging environmental science. Significance, methodology and perspectives. **European Journal of Soil Science**, v. 60, n. 6, p. 845-859, 2009. Disponível em: <doi: 10.1111/j.1365-2389.2009.01184.x>.

BERTOLA, M.; FERRARINI, A.; VISIOLI, G. Improvement of soil microbial diversity through sustainable agricultural practices and its evaluation by-omics approaches: A perspective for the environment, food quality and human safety. **Microorganisms**, v. 9, n. 7, p. 1400, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.3390/microorganisms9071400>.

BHAT, M. A.; KUMAR, V.; BHAT, M. A.; WANI, I. A.; DAR, F. L.; FAROOQ, I. BHATTI, F.; KOSER, R.; RAHMAN, S.; JAN, A. T. Mechanistic insights of the interaction of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) with plant roots toward enhancing plant productivity by alleviating salinity stress. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 1952, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01952>.

BOUCHEZ. T.; BLIEUX, A. L.; DEQUIEDT, S.; DOMAIZON, I.; DUFRESNE, A.; FERREIRA, S.; GODON, J. J.; HELLAL, J.; JOULIAN, C.; QUAISER, A.; MARTIN-LAURENT, F.; MAUFFRET, A.; MONIER, J. M.; PEYRET, P.; SCHMITT-KOPLIN, P.; SIBOURG, O.; D'OIRON, E.; BISPO, A.; DEPORTES, I.; GRAND, C.; CUNY, P.; MARON, P. A.; RANJARD, L. Molecular microbiology methods for environmental diagnosis. **Environmental Chemistry Letters**, v. 14, n. 4, p. 423-441, 2016. Disponível em: <DOI 10.1007/s10311-016-0581-3>.

BROSSI, M. J. L.; MENDES, L. W.; GERMANO, M. G.; LIMA, A. B.; TSAI, S. M. Assessment of bacterial bph gene in Amazonian Dark Earth and their adjacent soils. **PloS One**, v. 9, n. 6, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099597>.

BÜNEMANN, E. K.; BONGIORNO, G.; BAI, Z.; CREAMER, R. E.; DE DEYN, G.; GOEDE, R.; FLESKENS, L.; GEISSEN, V.; KUYPER, T. W.; MÄDER, P.; PULLEMAN, M.; SUKKEL, W.; van GROENIGEN, J. W.; BRUSSAARD, L. Soil quality–A critical review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 120, p. 105-125, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.01.030>. CARVALHO, L. R.; PEREIRA, L. E.T.; HUNGRIA, M.; CAMARGO, P. B.; SILVA, S. C. Nodulation and biological nitrogen fixation (BNF) in forage peanut (*Arachis pintoi*) cv. Belmonte subjected to grazing regimes. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 278, p. 96-106, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.agee.2019.02.016>.

CHANDWANI, S.; AMARESAN, N. Role of ACC deaminase producing bacteria for abiotic stress management and sustainable agriculture production. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, p. 1-17, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s11356-022-18745-7>.

CHOUDHARY, D. K.; KASOTIA, A.; JAIN, S.; VAISHNAV, A.; KUMARI, S.; SHARMA, K. P.; VARMA, A. Bacterial-mediated tolerance and resistance to plants under abiotic and biotic stresses. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 35, n. 1, p. 276-300, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00344-015-9521-x>.

COLE, E. J.; ZANDVAKILI, O. R.; BLANCHARD, J.; XING, B.; HASHEMI, M.; ETEMADI, F. Investigating responses of soil bacterial community composition to hardwood biochar amendment using high-throughput PCR sequencing. **Applied Soil Ecology**, v. 136, p. 80-85, 2019. Disponível em: < https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.12.010>.

DANIEL, R. The metagenomics of soil. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 6, p. 470-478, 2005. Disponível em: <doi:10.1038/nrmicro1160>.

DIVINO, J. A.; McALEER, M. Modelling sustainable international tourism demand to the Brazilian Amazon. **Environmental Modelling & Software**, v. 24, n. 12, p. 1411-1419, 2009. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.envsoft.2009.06.010>.

DO VALE JÚNIOR, J. F.; SOUZA, M. I. L.; NASCIMENTO, P. P. R. R.; CRUZ, L. S. Solos da Amazônia: etnopedologia e desenvolvimento sustentável. **Revista Agro@mbiente Online**, v. 5, n. 2, p. 158-165, 2011. Disponível em: http://dx.doi.org/10.18227/1982-8470ragro.v5i2.562>.

DUCA, D. R.; GLICK, B. R. Indole-3-acetic acid biosynthesis and its regulation in plantassociated bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 20, p. 8607-8619, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00253-020-10869-5>.

EMAMI, S.; ALIKHANI, H. A.; POURBABAEE, A. A.; ETESAMI, H.; MOTASHAREZADEH, B.; SARMADIAN, F. Consortium of endophyte and rhizosphere phosphate solubilizing bacteria improves phosphorous use efficiency in wheat cultivars in phosphorus deficient soils. **Rhizosphere**, v. 14, p. 100196, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100196>.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Solos, Embrapa Informática Agropecuária. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: EMBRAPA, 2º Ed., p. 627, 2009.

ESPOSITO, A.; COLANTUONO, C.; RUGGIERI, V.; CHIUSANO, M. L. Bioinformatics for agriculture in the next-generation sequencing era. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 3, n. 1, p. 9, 2016. Disponível em: <DOI 10.1186/s40538-016-0054-8>.

ETESAMI, H.; JEONG, B. R.; GLICK, B. R. Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi, phosphate–solubilizing bacteria, and silicon to P uptake by plant. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 699618, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fpls.2021.699618>.

FERREIRA, M. D. P.; COELHO, A. B. Desmatamento Recente nos Estados da Amazônia Legal: uma análise da contribuição dos preços agrícolas e das políticas governamentais. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 53, n. 1, p. 91-108, 2015. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1590/1234-56781806-9479005301005>.

FRANCO-DUARTE, R.; ČERNÁKOVÁ, L.; KADAM, S.; KAUSHIK, K. S.; SALEHI, B.; BEVILACQUA, A.; CORBO, M. R.; ANTOLAK, H.; DYBKA-STEPIEN, K.; LESZCZEWICZ, M.; TINTINO, S. R.; SOUZA, V. C. A.; SHARIFI-RAD, J.; COUTINHO, H. D. M.; MARTINS, N.; RODRIGUES, C. F. Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms—from past to present. **Microorganisms**, v. 7, n. 5, p. 130, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050130>.

GAETE, A.; MANDAKOVIC, D.; GONZÁLEZ, M. Isolation and identification of soil bacteria from extreme environments of Chile and their plant beneficial characteristics. **Microorganisms**, v. 8, n. 8, p. 1213, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.3390/microorganisms8081213>.

GLASER, B.; BIRK, J. J. State of the scientific knowledge on properties and genesis of Anthropogenic Dark Earths in Central Amazonia (terra preta de Índio). **Geochimica et Cosmochimica acta**, v. 82, p. 39-51, 2012. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.gca.2010.11.029>.

GROSSMAN, J. M.; O'Neill, B. E.; TSAI, S. M.; LIANG, B. NEVES, E.; LEHMANN, THIES, J. E. Amazonian anthrosols support similar microbial communities that differ distinctly from those extant in adjacent, unmodified soils of the same mineralogy. **Microbial ecology**, v. 60, n. 1, p. 192-205, 2010. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00248-010-9689-3>.

HAKIM, S.; NAQQASH, T.; NAWAZ, M. S.; LARAIB, I.; SIDDIQUE, M. J.; ZIA, R.; MIRZA, M. S.; IMRAN, A. Rhizosphere engineering with plant growth-promoting microorganisms for agriculture and ecological sustainability. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, p. 617157, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.617157>.

HAMMER, E. C.; RILLIG, M. C. The influence of different stresses on glomalin levels in an arbuscular mycorrhizal fungus—salinity increases glomalin content. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e28426, 2011. Disponível em: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028426>.

HASSAN, M. K.; McINROY, J. A.; KLOEPPER, J. W. The interactions of rhizodeposits with plant growth-promoting rhizobacteria in the rhizosphere: a review. **Agriculture**, v. 9, n. 7, p. 142, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.3390/agriculture9070142>.

HEMMAT-JOU, M. H.; SAFARI-SINEGANI, A.A.; MIRZAIE-ASL, A.; TAHMOURESPOUR, A. Analysis of microbial communities in heavy metals-contaminated soils using the metagenomic approach. **Ecotoxicology**, v. 27, n. 9, p. 1281-1291, 2018. Disponível em: ">https://doi.org/10.1007/s10646-018-1981-x>. HUO, Y.; KANG, J. P.; AHN, J. C.; KIM, Y. J.; PIAO, C. H.; YANG, D. U.; YANG, D. C. Siderophore-producing rhizobacteria reduce heavy metal-induced oxidative stress in Panax ginseng Meyer. **Journal of ginseng research**, v. 45, n. 2, p. 218-227, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jgr.2019.12.008>.

IRVING, T. B.; ALPTEKIN, B.; KLEVEN, B.; ANÉ, J. A critical review of 25 years of glomalin research: a better mechanical understanding and robust quantification techniques are required. **New Phytologist**, v. 232, n. 4, p. 1572-1581, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1111/nph.17713>.

JANSSON, J. K.; HOFMOCKEL, K. S. The soil microbiome—from metagenomics to metaphenomics. **Current opinion in microbiology**, v. 43, p. 162-168, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.01.013>.

JIA, X. ZHAO, Y.; LIU, T.; HUANG, S.; CHANG, Y. Elevated CO₂ increases glomalinrelated soil protein (GRSP) in the rhizosphere of *Robinia pseudoacacia* L. seedlings in Pb-and Cd-contaminated soils. **Environmental Pollution**, v. 218, p. 349-357, 2016. Disponível em: < https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.07.010>.

JONIEC, J. Enzymatic activity as an indicator of regeneration processes in degraded soil reclaimed with various types of waste. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 15, n. 10, p. 2241-2252, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s13762-017-1602-x.

KAKIRDE, K. S.; PARSLEY, L. C.; LILES, M. R. Size does matter: application-driven approaches for soil metagenomics. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 11, p. 1911-1923, 2010. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.07.021>.

KAUSHAL, M. Insights into microbially induced salt tolerance and endurance mechanisms (STEM) in plants. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1518, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01518>.

KERN, D.C.; KÄMPF, N. Ação antrópica e pedogênese em solos com Terra Preta em Cachoeira-Porteira, Pará. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, v.1, p. 187-201, 2005.

KERN, J.; GIANI, L.; TEIXEIRA, W.; LANZA, G.; GLASER, B. What can we learn from ancient fertile anthropic soil (Amazonian Dark Earths, shell mounds, plaggen soil) for soil carbon sequestration?. **Catena**, v. 172, p. 104-112, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.catena.2018.08.008>.

KHAN, N.; BANO, A.; ALI, S.; BABAR, M. A. Crosstalk amongst phytohormones from planta and PGPR under biotic and abiotic stresses. **Plant Growth Regulation**, v. 90, n. 2, p. 189-203, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s10725-020-00571-x.

KIM, J.; SPAROVEK, G.; LONGO, R. M.; MELO, W. J.; CROWLEY, D. Bacterial diversity of terra preta and pristine forest soil from the Western Amazon. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 684-690, 2007. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.08.010>.

KNIEF, C. Analysis of plant microbe interactions in the era of next generation sequencing technologies. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 216, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00216>.

KOZICH, J. J.; WESTCOTT, S. L.; BAXTER, N. T.; HIGHLANDER, S. K.; SCHLOSS, P. D. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 17, p. 5112-5120, 2013. Disponível em: <DOI: 10.1128/AEM.01043-13>.

KRAMER, J.; ÖZKAYA, Ö.; KÜMMERLI, R. Bacterial siderophores in community and host interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 152-163, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1038/s41579-019-0284-4>.

KUMAR, A.; SINGH, S.; GAURAV, A. K.; SRIVASTAVA, S.; VERMA, J. P. Plant growth-promoting bacteria: biological tools for the mitigation of salinity stress in plants. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1216, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01216>.

LEMOS, L. N.; SOUZA, R. C.; CANNAVAN, F. S.; PATRICIO. A.; PYLRO, V. S.; HANADA, R. E.; MUI, T. S. Metagenome sequencing of the microbial community of two Brazilian anthropogenic Amazon dark earth sites, Brazil. **Genomics data**, v. 10, p. 167-168, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.gdata.2016.11.015>.

LEWIS, W. H.; TAHON, G.; GEESINK, P.; SOUSA, D. Z.; ETTEMA, T. J. G. Innovations to culturing the uncultured microbial majority. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 225-240, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1038/s41579-020-00458-8>.

LIMA, A. B.; MUNIZ, A. W.; DUMONT, M. G. Activity and abundance of methaneoxidizing bacteria in secondary forest and manioc plantations of Amazonian Dark Earth and their adjacent soils. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 550, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00550>.

LIMA, H. N.; SCHAEFER, C. E. R.; MELLO, J. W. V.; GILKES, R. J. G.; KER, J. C. Pedogenesis and pre-Colombian land use of "Terra Preta Anthrosols" ("Indian black earth") of Western Amazonia. **Geoderma**, v. 110, n. 1-2, p. 1-17, 2002. Disponível em: https://doi.org/10.1016/S0016-7061(02)00141-6>.

LIN, W.; WU, L.; LIN, S.; ZHANG, A.; ZHOU, M.; LIN, R.; WANG, H.; CHEN, J.; ZHANG, Z.; LIN, R. Metaproteomic analysis of ratoon sugarcane rhizospheric soil. **BMC microbiology**, v. 13, n. 1, p. 135, 2013. Disponível em: https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-135.

LINO, I. A. N.; SANTOS, V. M.; ESCOBAR, I. E. C.; SILVA, D. K. A.; ARAÚJO, A. S. F.; MAIA, L. C. Soil enzymatic activity in *Eucalyptus grandis* plantations of different ages. **Land degradation & development**, v. 27, n. 1, p. 77-82, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1002/ldr.2454>. LIU, D.; KEIBLINGER, K. M.; SCHINDLBACHER, A. WEGNER, U.; SUN, H.; FUCHS, S.; LASSEK, C.; RIEDEL, K.; ZECHMEISTER-BOLTENSTERN, S. Microbial functionality as affected by experimental warming of a temperate mountain forest soil—a metaproteomics survey. **Applied soil ecology**, v. 117, p. 196-202, 2017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.04.021>.

LOBO, C. B.; TOMÁS, M. S. J.; VIRUEL, E.; FERRERO, M. A.; LUCCA, M. E. Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies. **Microbiological research**, v. 219, p. 12-25, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.10.012>.

LUCHETA, A. R.; CANNAVAN, F. S.; ROESCH, L. F. W.; TSAI, S. M.; KURAMAE, E. E. Fungal community assembly in the Amazonian Dark Earth. **Microbial ecology**, v. 71, n. 4, p. 962-973, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00248-015-0703-7>.

LUCHETA, A. R.; CANNAVAN, F. S.; TSAI, S. M.; KURAMAE, E. E. Amazonian Dark Earth and its black carbon particles harbor different fungal abundance and diversity. **Pedosphere**, v. 27, n. 5, p. 832-845, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60415-6>.

LUO, X.; FU, X.; YANG, Y.; CAI, P.; PENG, S.; CHEN, W.; HUANG, Q. Microbial communities play important roles in modulating paddy soil fertility. **Scientific reports**, v. 6, p. 20326, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1038/srep20326>.

MACEDO, R. S. TEIXEIRA W. G.; CORRÊA, M. M.; MARTINS, G. C. VIDAL-TORRADO, P. Pedogenetic processes in anthrosols with pretic horizon (Amazonian Dark Earth) in Central Amazon, Brazil. **PloS one**, v. 12, n. 5, p. e0178038, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178038>.

MAEZUMI, S. Y.; ROBINSON, M.; SOUZA, J.; URREGO, D. H.; SCHAAN, D.; ALVES, D.; IRIARTE, J. New insights from pre-columbian land use and fire management in Amazonian Dark Earth forests. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 6, p. 111, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fevo.2018.00111>.

MAGURNO, F.; MALICKA, M.; POSTA, K.; WOZNIAK, G.; LUMINI, E.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. Glomalin gene as molecular marker for functional diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 55, p. 411-417, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00374-019-01354-x>.

MAHMUD, K.; MAKAJU, S.; IBRAHIM, R.; MISSAOUI, A. Current progress in nitrogen fixing plants and microbiome research. **Plants**, v. 9, n. 1, p. 97, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.3390/plants9010097>.

MAI, Z.; SU, H.; YANG, J.; HUANG, S.; ZHANG, S. Cloning and characterization of a novel GH44 family endoglucanase from mangrove soil metagenomic library. **Biotechnology letters**, v. 36, n. 8, p. 1701-1709, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s10529-014-1531-4>.

MARON, P.; RANJARD, L.; MOUGEL, C.; LEMANCEAU, P. Metaproteomics: a new approach for studying functional microbial ecology. **Microbial ecology**, v. 53, n. 3, p. 486-493, 2007. Disponível em: <DOI: 10.1007/s00248-006-9196-8>.

MOREAU, D.; BARDGETT, R. D.; FINLAY, R. D.; JONES, D. L.; PHILIPPOT, L. A plant perspective on nitrogen cycling in the rhizosphere. **Functional Ecology**, v. 33, n. 4, p. 540-552, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1111/1365-2435.13303>.

MOSA, K. A.; SAADOUN, I.; KUMAR, K.; HELMY, M.; DHANKHER, P. Potential biotechnological strategies for the cleanup of heavy metals and metalloids. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 303, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00303>.

NAIK, K.; MISHRA, S.; SRICHANDAN, H.; SINGH, P. K.; SARANGI, P. K. Plant growth promoting microbes: Potential link to sustainable agriculture and environment. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 21, p. 101326, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101326>.

NAVARRETE, A. A.; CANNAVAN, F. S.; TAKETANI, R. G.; TSAI, S. M. A molecular survey of the diversity of microbial communities in different Amazonian agricultural model systems. **Diversity**, v. 2, p. 787-809, 2010. Disponível em: https://doi.org/10.3390/d2050787>.

NAVARRETE, A. A.; KURAMAE, E. E.; HOLLANDER, M.; PIJL, A. S.; van VEEN, J. A.; TSAI, S. M. Acidobacterial community responses to agricultural management of soybean in Amazon forest soils. **FEMS microbiology ecology**, v. 83, n. 3, p. 607-621, 2013. Disponível em: https://doi.org/10.1111/1574-6941.12018>.

OLANREWAJU, O. S.; GLICK, B. R.; BABALOLA, O. O. Mechanisms of action of plant growth promoting ornala. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 11, p. 1-16, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s11274-017-2364-9>.

OLEŃSKA, E.; MALEK, W.; WÓJCIK, M.; SWIECICKA, I.; THIJS, S.; VANGRONSVELD, J. Beneficial features of plant growth-promoting rhizobacteria for improving plant growth and health in challenging conditions: A methodical review. **Science of the Total Environment**, v. 743, p. 140682, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140682>.

O'NEILL, B.; GROSSMAN, J.; TSAI, M. T.; GOMES, J. E.; LEHMAN, J.; PETERSON, J.; NEVES, E.; THIES, J. E. Bacterial community composition in Brazilian Anthrosols and adjacent soils characterized using culturing and molecular identification. Microbial ecology, v. 58, p. 23-35, 2009. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00248-009-9515-y>.

PAGANO, M.; RIBEIRO-SOARES, J.; CANÇADO, L. G.; FALCÃO, N. P. S.; GONÇALVES, V. N.; ROSA, L. H.; TAKAHASHI, J. A.; ACHETE, C. A.; JORIO, A. Depth dependence of black carbon structure, elemental and microbiological composition in anthropic Amazonian dark soil. **Soil and Tillage Research**, v. 155, p. 298-307, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.still.2015.09.001>. PANDEY, S. D.; ROCHA, L. C.; PEREIRA, G.; DESCHAMPS, C.; CAMPOS, J. L.E.; FALCÃO, N.; PROUS, A.; JORIO, A. Properties of carbon particles in archeological and natural Amazon rainforest soils. **Catena**, v. 194, pág. 104687, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.catena.2020.104687>.

PARIHAR, M.; RAKSHIT, A.; MEENA, V. S.; GUPTA, V. K; RANA, K.; CHOUDHARY, M.; TIWARI, G.; MISHRA, P. K.; PATTANAYAK, A.; BISHT, J. K.; JATAV, S. S.; KHATI, P.; JATAV, H. S. The potential of arbuscular mycorrhizal fungi in C cycling: a review. **Archives of Microbiology**, v. 202, p. 1581-1596, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00203-020-01915-x.

PEREIRA, A. S. A. P.; SANTOS, V. J.; ALVES, S. C.; SILVA, A. A.; SILVA, C. G.; CALIJURI, M. L. Contribution of rural settlements to the deforestation dynamics in the Legal Amazon. Land Use Policy, v. 115, p. 106039, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2022.106039>.

POEPLAU, C.; HERRMANN, A. M.; KÄTTERER, T. Opposing effects of nitrogen and phosphorus on soil microbial metabolism and the implications for soil carbon storage. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 100, p. 83-91, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.05.021>.

POVEDA, J.; GONZÁLEZ-ANDRÉS, F. *Bacillus* as a source of phytohormones for use in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 23, p. 8629-8645, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00253-021-11492-8>.

QUAIL, M. A. SMITH, M.; COUPLAND, P.; OTTO, T. D.; HARRIS, S. R.; CONNOR, T. R.; BERTONI, A.; SWERLOW, H. P; GU, Y. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. **BMC genomics**, v. 13, n. 1, p. 341, 2012. Disponível em: https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-341.

RAMAKRISHNA, W.; YADAV, R.; LI, K. Plant growth promoting bacteria in agriculture: two sides of a coin. **Applied Soil Ecology**, v. 138, p. 10-18, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.02.019>.

RANA, K. L.; KOUR, D.; KAUR, T.; DEVI, R.; YADAV, A. N.; YADAV, N.; DHALIWAL, H. S.; SAXENA, A. K. Endophytic microbes: biodiversity, plant growthpromoting mechanisms and potential applications for agricultural sustainability. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 113, n. 8, p. 1075-1107, 2020. Disponível em: ">https://doi.org/10.1007/s10482-020-01429-y>">https://doi.org/10.1007/s10482-020-01429-y>.

RAWAT, P.; DAS, S.; SHANKHDHAR, D.; SHANKHDHAR, S. C. Phosphate-solubilizing microorganisms: mechanism and their role in phosphate solubilization and uptake. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 21, n. 1, p. 49-68, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s42729-020-00342-7>.

REZENDE, C. C.; SILVA, M. A.; FRASCA, L. L. M.; FARIA, D. R.; FILIPPI, M. C. C.; LANNA, A. C.; NASCENTE, A. S. Microrganismos multifuncionais: utilização na agricultura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e50810212725, 2021. Disponível em: <DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i2.12725>.

ROCHA, S. M. B.; ANTUNES, J. E. L.; ARAUJO, J. M. A.; AQUINO, J. P. A.; MELO, W. J.; MENDES, L. W.; ARAUJO, A. S. F. Capability of plant growth-promoting bacteria in chromium-contaminated soil after application of composted tannery sludge. **Annals of Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 665-671, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s13213-019-01455-w.

SANDRINI, M.; NERVA, L.; SILLO, F.; BALESTRINI, R.; CHITARRA, W.; ZAMPIERI, E. Abiotic stress and belowground ornalae: The potential of omics approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1091, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.3390/ijms23031091>.

SARFRAZ, R.; HUSSAIN, A.; SABIR, A.; FEKIH, I. B.; DITTA, A. XING, S. Role of biochar and plant growth promoting rhizobacteria to enhance soil carbon sequestration—a review. **Environmental monitoring and assessment**, v. 191, n. 4, p. 1-13, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s10661-019-7400-9>.

SCHLOSS, P. D. Amplicon sequence variants artificially split bacterial genomes into separate clusters. **Msphere**, v. 6, n. 4, p. e00191-21, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1128/mSphere.00191-21.

SCHLOTER, M.; NANNIPIERI, P.; SØRENSEN, S. J.; van ELSAS, J. D. Microbial indicators for soil quality. **Biology and Fertility of Soils**, v. 54, n. 1, p. 1-10, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00374-017-1248-3.

SCHÜTZ, M.; BIGLER, L.; GIREL, S.; LASCHKE, L.; SICKER, D.; SCHULZ, M. Conversions of Benzoxazinoids and Downstream Metabolites by Soil Microorganisms. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 7, p. 238, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00238>.

SHARMA, P.; SINGH, S. P.; IQBAL, H. M. N.; TONG, Y. W. Omics approaches in bioremediation of environmental contaminants: An integrated approach for environmental safety and sustainability. **Environmental Research**, v. 211, p. 113102, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113102>.

SINGH, P. K.; SINGH, M.; TRIPATHI, B. N. Glomalin: an arbuscular mycorrhizal fungal soil protein. **Protoplasma**, v. 250, p. 663-669, 2012. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00709-012-0453-z>.

SINGH, P.; SINGH, R. K.; ZHOU, Y. WANG, J.; JIANG, Y.; SHEN, N.; WANG, Y.; YANG, L.; JIANG, M. Unlocking the strength of plant growth promoting *Pseudomonas* in improving crop productivity in normal and challenging environments: a review. **Journal of Plant Interactions**, v. 17, n. 1, p. 220-238, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.1080/17429145.2022.2029963>.

SOFY, M. R.; ABOSEIDAH, A. A.; HENEIDAK, S. A.; AHMED, H. R. ACC deaminase containing endophytic bacteria ameliorate salt stress in *Pisum sativum* through reduced oxidative damage and induction of antioxidative defense systems. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 30, p. 40971-40991, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s11356-021-13585-3>.

SOUZA, L. C.; LIMA, H. V.; RODRIGUES, S.; KERN, D. C.; SILVA, A. P.; PICCININ, J. L. Chemical and physical properties of an anthropogenic dark earth soil from Bragança, Para, Eastern Amazon. **Acta Amazonica**, v. 46, n. 4, p. 337-344, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1590/1809-4392201505663>.

SOUZA, R. C.; CANNAVAN, F. S.; KANZAKI, L. I. B.; MENDES, L. W.; FERRARI, B. M.; HANADA, R. E.; TSAI, S. M. Analysis of a bacterial community structure and the diversity of phzF gene in samples of the Amazonian Dark Earths cultivated with cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Wald]. African Journal of Agricultural Research, v. 13, n. 38, p. 1980-1989, 2018. Disponível em: <DOI: 10.5897/AJAR2018.13021>.

SUDAM – SUPERINTENDÊNCIA DO DESENVOLVIMENTO DA AMAZÔNIA. Legislação sobre a criação da Amazônia Legal. Disponível em: <http://www.sudam.gov.br/index.php/convenios-termos-cooperacao/58-acesso-ainformacao/86-legislacao-da-amazonia>. Acesso em 10 de abril 2020.

TAKETANI, R. G.; LIMA, A. B.; JESUS, E. C.; TEIXEIRA, W. G.; TIEDJE, J. M.; TSAI, S. M. Bacterial community composition of anthropogenic biochar and Amazonian anthrosols assessed by 16S Rrna gene 454 pyrosequencing. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 104, n. 2, p. 233-242, 2013. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s10482-013-9942-0>.

TAKETANI, R. G.; TSAI, S. M. The influence of different land uses on the structure of archaeal communities in Amazonian anthrosols based on 16S Rrna and amoA genes. **Microbial ecology**, v. 59, n. 4, p. 734-743, 2010. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00248-010-9638-1>.

TURAN, V.; SCHRÖDER, P.; BILEN, S.; INSAM, H.; JUÁREZ, M. F. Co-inoculation effect of *Rhizobium* and *Achillea millefolium* L. oil extracts on growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and soil microbial-chemical properties. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1038/s41598-019-51587-x>.

VASCONCELLOS, R. L. F.; BONFIM, J. A.; BARETTA, D.; CARDOSO, E. J. B. N. Arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin-related soil protein as potential indicators of soil quality in a recuperation gradient of the Atlantic forest in Brazil. **Land Degradation & Development**, v. 27, n. 2, p. 325-334, 2013. Disponível em: https://doi.org/10.1002/ldr.2228>.

VENTURINI, A. M.; GONTIJO, J. B.; MANDRO, J. A.; PAULA, F. S.; YOSHIURA, C. A.; FRANÇA, A. G.; TSAI, S. M. Genome-resolved metagenomics reveals novel archaeal and bacterial genomes from Amazonian forest and pasture soils. **Microbial Genomics**, v. 8, n. 7, p. 000853, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.1099/mgen.0.000853>.

VESTERGAARD, G.; SCHULZ, S.; SCHÖLER, A.; SCHLOTER, M. Making big data smart—how to use metagenomics to understand soil quality. **Biology and Fertility of Soils**, v. 53, p. 479-484, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00374-017-1191-3>.

WANG, Q.; WANG, W.; HE, X.; ZHANG, W.; SONG, K.; HAN, S. Role and variation of the amount and composition of glomalin in soil properties in farmland and adjacent plantations with reference to a primary forest in North-Eastern China. **PloS one**, v. 10, n. 10, p. e0139623, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139623>.

WEN, C.; WU, L.; QIN, Y.; VAN NOSTRAND, J. D.; NING, D.; SUN, B.; XUE, K.; LIU, F.; DENG, Y.; LIANG, Y.; ZHOU, J. Evaluation of the reproducibility of amplicon sequencing with Illumina MiSeq platform. **PloS one**, v. 12, n. 4, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176716>.

WOICIECHOWSKI, T.; LOMBARDI, K. C.; GARCIA, A. O.; GOMES, G. S. Nutrientes e umidade do solo após a incorporação de biocarvão em um plantio de *Eucalyptus benthamii*. **Ciência Florestal**, v. 28, n. 4, p. 1455-1464, 2018. Disponível em: <DOI: 10.5902/1980509835053>.

WONGDEE, J.; BOONKERD, N.; TEAUMROONG, N.; TITTABUTR, P.; GIRAUD, E. Regulation of nitrogen fixation in *Bradyrhizobium* sp. Strain DOA9 involves two distinct NifA regulatory proteins that are functionally redundant during symbiosis but not during free-living growth. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1644, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01644>.

WRIGHT, S. F.; UPADHYAYA, A. Extraction of an Abundant and Unusual Protein from Soil and Comparison with Hyphal Protein of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. **Soil Science**, Oxford, v. 161, p. 575-586, 1996. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1097/00010694-199609000-00003>.

WRIGHT, S. F.; UPADHYAYA, A. A Survey of Soils for Aggregate Stability and Glomalin, a Glycoprotein Produced by Hyphae of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 198, p. 97-107, 1998. Disponível em: https://doi.org/10.1023/A:1004347701584>.

WU, L.; WEN, C; QIN, Y; YIN, H.; TU, Q.; VAN NOSTRAND, J. D.; YUAN, T.; YUAN, M.; DENG, Y.; ZHOU, J. Phasing amplicon sequencing on Illumina Miseq for robust environmental microbial community analysis. **Bmc Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 125, 2015. Disponível em: <DOI10.1186/s12866-015-0450-4>.

WU, S.; NAN, F.; JIANG, J.; QIU, J.; ZHANG, Y.; QIAO, B.; LI, S.; XIN, Z. Molecular cloning, expression and characterization of a novel feruloyl esterase from a soil metagenomic library with phthalate-degrading activity. **Biotechnology letters**, v. 41, n. 8-9, p. 995-1006, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s10529-019-02693-3>.

ZHANG, X.; ZHANG, D.; SUN, W.; WANG, T. The adaptive mechanism of plants to iron deficiency via iron uptake, transport, and homeostasis. **International jornal of molecular sciences**, v. 20, n. 10, p. 2424, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.3390/ijms20102424>.

3 ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS ORIUNDAS DE UM PERFIL DE TERRA PRETA DA AMAZÔNIA

Resumo

A Terra Preta da Amazônia (TPA) foi formada por meio de processos antropogênicos, apresenta elevada fertilidade, é rica em matéria orgânica e de coloração escura. Esse contraste com os solos da região amazônica, que são de baixa fertilidade, tem despertado o interesse de grupos de pesquisa a fim de investigar a origem da fertilidade desses solos. Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi isolar, caracterizar, e identificar bactérias, de um perfil de TPA, com potencial para o uso agrícola, como inoculantes na promoção de crescimento de plantas e/ou como agentes de controle biológico. O solo do perfil de TPA e o solo adjacente (ADJ) foram coletados no município de Bragança-Pará, para realização das análises químicas, granulometria e prospecção de bactérias. A prospecção de bactérias do perfil de TPA foi realizada pelo método de diluição seriada e, posteriormente, os isolados foram testados "in vitro" quanto aos mecanismos de promoção de crescimento de plantas: produção de Ácido Indol-Acético (AIA), sideróforos, solubilização de fosfato e fixação biológica de nitrogênio (FBN). Além disso, foram selecionados 52 isolados para extração de DNA, amplificação dos genes nifH e acdS e sequenciamento do gene 16S rRNA.Os atributos químicos revelaram pH ácido, saturação por alumínio elevada e saturação por bases reduzida, soma de bases maior em profundidade, assim como a CTC. A glomalina total e facilmente extraível foram superiores no horizonte A. 466 bactérias foram isoladas e caracterizadas, sendo: 149 do HA, 194 do HB e 123 do HC. Os isolados foram agrupados por horizonte de acordo com as características fenotípicas e distribuídos em grupos distintos. Foram gerados 77 grupos no HA, 115 grupos no HB e 73 grupos no HC. Todos os isolados foram testados quanto à solubilização de fosfato de cálcio bibásico, produção de ácido indol-acético (AIA) e produção de sideróforos. Os isolados que produziram pelo menos um dos mecanismos anteriores foram testados quanto à fixação biológica de nitrogênio (FBN) em meio semissólido e, baseado nos mecanismos anteriores, os isolados que apresentaram pelo menos dois mecanismos (52) foram selecionados para os ensaios moleculares. 23 % dos isolados foram capazes de solubilizar fosfato no HA, 15 % no HB e 16 % no HC. Quanto à produção de AIA, no HA 35 % dos isolados apresentaram produção alta e 65 % média produção de AIA, no HB 55 % e 45 %, respectivamente. No HC 70 % dos isolados apresentaram produção média, 23 % alta e 7 % elevada produção de AIA. No HA 1% dos isolados produziu sideróforos, no HB 4 % e no HC 3 %. Quanto a FBN, 84 % dos isolados formaram película em meio semissólido no HA, 91 % no HB e 84 % no HC. Em relação aos genes funcionais, 23 isolados foram positivos para a presença do gene ni/H, 5 para o gene acdS e 46 foram enviados para o sequenciamento do gene 16S rRNA. O sequenciamento das bactérias revelou um predomínio de dois filos de grande importância no solo: Proteobacteria e Firmicutes, sendo a maioria dos indivíduos pertencentes aos gêneros Pseudomonas sp. e Bacillus sp., respectivamente. Com base nos mecanismos avaliados " in vitro", quatro dos isolados obtidos: 193 (Bacillus velezensis), 351 A (Pseudomonas pisciculturae), 434 (Pseudomonas kitaguniensis) e 435 (Pseudomonas kitaguniensis) se destacaram pela capacidade de promover o crescimento de plantas revelando o elevado potencial biotecnológico dos solos de Terra Preta da Amazônia. Para confirmar a eficiência dessas bactérias são recomendados testes em casa de vegetação para fins de autenticação, recomendação e formulação de um bioproduto.

Palavras-chave: Bacillus. Pseudomonas. Promoção de Crescimento vegetal. Biotecnologia.

3 ISOLATION, CHARACTERIZATION AND IDENTIFICATION OF BACTERIA FROM A PROFILE OF AMAZONIAN DARK EARTH WITH POTENTIAL FOR PLANT GROWTH PROMOTION

Abstract

The Amazonian Dark Earth (ADE) was formed through anthropogenic processes, is highly fertile, rich in organic matter, and dark in color. This contrast with the soils of the Amazon region, which are of low fertility, has aroused the interest of research groups in order to investigate the origin of the fertility of these soils. In this context, the objective of this work was to isolate, characterize, and identify bacteria, from a ADE profile, with potential for agricultural use as inoculants for plant growth promotion and/or as biological control agents. The soil from the ADE profile and the adjacent soil (ADJ) were collected in the municipality of Bragança, Pará, to perform chemical analyses, granulometry and prospection of bacteria. The prospection of bacteria from the ADE profile was performed by serial dilution method and, subsequently, the isolates were tested "in vitro" for plant growth promoting mechanisms: Indol-Acetic Acid (IAA) production, siderophores, phosphate solubilization and biological nitrogen fixation (BNF). In addition, 52 isolates were selected for DNA extraction, amplification of nifH and acdS genes, and sequencing of the 16S rRNA gene. Chemical attributes revealed acidic pH, high aluminum saturation and low base saturation, higher base sum at depth, as well as CEC. Total and easily extractable glomalin were higher in the A horizon. 466 bacteria were isolated and characterized: 149 from HA, 194 from HB, and 123 from HC. The isolates were grouped by horizon according to phenotypic characteristics and distributed in distinct groups. A total of 77 groups were generated in HA, 115 groups in HB, and 73 groups in HC. All isolates were tested for bibasic calcium phosphate solubilization, indole-acetic acid (IAA) production, and siderophore production. The isolates that produced at least one of the previous mechanisms were tested for biological nitrogen fixation (BNF) in semi-solid medium and, based on the previous mechanisms, the isolates that presented at least two mechanisms (52) were selected for molecular assays. 23 % of the isolates were able to solubilize phosphate in HA, 15 % in HB and 16 % in HC. Regarding IAA production, in HA 35 % of the isolates showed high and 65 % medium IAA production, in HB 55 % and 45 %, respectively. In HC 70 % of the isolates showed medium, 23 % high and 7 % high IAA production. In HA 1 % of the isolates produced siderophores, in HB 4 % and in HC 3 %. Regarding BNF, 84 % of the isolates formed a film on semi-solid medium in HA, 91 % in HB and 84 % in HC. Regarding functional genes, 23 isolates were positive for the presence of the nifH gene, 5 for the acdS gene and 46 were sent for 16S rRNA gene sequencing. The sequencing of the bacteria revealed a predominance of two phyla of great importance in soil: Proteobacteria and Firmicutes, most individuals belonging to the genera Pseudomonas sp. and Bacillus sp. respectively. Based on the mechanisms evaluated "in vitro", four of the isolates obtained: 193 (Bacillus velezensis), 351 A (Pseudomonas pisciculturae), 434 (Pseudomonas kitaguniensis) and 435 (Pseudomonas kitaguniensis) stood out for their ability to promote plant growth, revealing the high biotechnological potential of Terra Preta soils in the Amazon. To confirm the efficiency of these bacteria, greenhouse tests are recommended for authentication, recommendation and formulation of a bioproduct.

Keywords: Bacillus. Pseudomonas. Plant Growth Promotion. Biotechnology.

3.1 INTRODUÇÃO

A floresta amazônica é dividida em ecorregiões que apresentam diferentes tipos de solo. Dentre esses solos podem ser encontradas manchas de Terra Preta da Amazônia (TPA) também conhecida como Terra Preta de Índio (TPI), distribuídas pela Amazônia (BENTO et al., 2020). Os solos de TPA são considerados como antropogênicos devido a presença de artefatos como, por exemplo, cerâmica, carvão, cinzas, restos animais e vegetais. A presença desses resíduos que, frequentemente eram depositados no solo, deu origem a um horizonte superficial rico em matéria orgânica e nutrientes que favorecem a atividade e diversidade microbiana na TPA (BARBOSA et al., 2020).

As manchas de TPA são solos de elevada fertilidade, contrastando com os demais solos da Amazônia, devido ao carbono presente de forma reativa e recalcitrante na matéria orgânica. Esse carbono permanece por mais tempo no solo aumentando a capacidade de troca de cátions (CTC) e, consequentemente, aumentando a capacidade de retenção de macronutrientes e micronutrientes, evidenciando o potencial agrícola desses solos (SÁTIRO et al., 2021). A elevada disponibilidade de nutrientes nos solos de TPA modula a atividade microbiana favorecendo o aumento da abundância e diversidade de micro-organismos nesses solos (LIMA et al., 2015).

No solo, os micro-organismos participam de importantes processos, como decomposição da matéria orgânica, fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, síntese de fitohormônios, ativação do sistema de defesa, antibiose e produção de sideróforos (YOU et al., 2020). A microbiota é considerada um indicador muito sensível da qualidade do solo e, com isso, os micro-organismos desenvolveram importantes habilidades que vão desde estabelecer relações diretas entre micro-organismo-micro e relações entre os micro-organismo e as planta, perceber flutuações ambientais e adaptar-se a condições de estresse (ROMERO-GUTIÉRREZ et al., 2020).

Para acessar os micro-organismos do solo, podem ser utilizadas técnicas moleculares baseadas na extração de DNA e RNA do solo ou técnicas dependentes de cultivo que nos permitem avaliar morfologicamente a microbiota, identificar os micro-organismos através do sequenciamento do DNA, avaliar a capacidade desses micro-organismos produzir mecanismos promotores de crescimento de plantas e testar seu potencial biotecnológico (NKONGOLO; NARENDRULA-KOTHA, 2020; ROCHA et al.; 2020). As bactérias promotoras de crescimento de plantas podem ser isoladas do solo ou da superfície das plantas, são atraídas por sinais liberados pelas plantas e colonizam as raízes ou superfície dos vegetais liberando metabólitos capazes de estimular o crescimento das plantas (TAPIA-VÁZQUEZ et al., 2020).

As BPCP podem auxiliar no crescimento das plantas através de mecanismos que vão desde a solubilização e disponibilização de nutrientes à produção de fitohormônios e produção de compostos capazes de quelar o ferro, até a ativação do sistema de defesa, produção de substâncias que auxiliam na resistência e proteção contra o ataque de patógenos (SHEIRDIL et al., 2019). Com o intuito de reduzir os gastos com insumos agrícolas, os efeitos do estresse e as perdas dos nutrientes dos fertilizantes inorgânicos por lixiviação, as BPCP têm despertado o interesse de pesquisadores a fim de melhorar a produtividades de grandes culturas, garantindo, assim, uma agricultura sustentável (ALBDAIWI et al., 2019).

O nitrogênio (N) e o fósforo (P) são elementos essenciais para o desenvolvimento das plantas, constituintes essenciais de biomoléculas e macromoléculas. Os micro-organismos participam ativamente do processo de mineralização desses nutrientes através de processos enzimáticos e liberação de ácidos orgânicos (OLEŃSKA et al., 2020). Embora seja abundante na atmosfera, o nitrogênio atmosférico (N₂) encontra-se numa forma indisponível para as culturas. Por isso necessita do auxílio de micro-organismos diazotróficos capazes de quebrar a tripla ligação do N₂, processo que requer um alto gasto energético, e convertendo-o a amônia, forma na qual as plantas conseguem assimilar o nitrogênio (FERREIRA; SOARES; SOARES, 2019). A maior parte do fósforo existente na crosta terrestre está na forma inorgânica (Pi), sendo encontrado em rochas fosfatadas que são utilizadas para a produção de fertilizantes inorgânicos. Algumas cepas bacterianas têm demonstrado resultados promissores na solubilização de fosfato inorgânico (BSPi) e podem ser utilizadas na produção de biofertilizantes (NAIK et al., 2019).

O ferro (Fe) é um micronutriente requerido em pequenas quantidades pelas plantas e micro-organismos (GHOSH; BER; CHAKRABARTY, 2020). Os sideróforos são metabólitos secundários de baixo peso molecular produzidos por bactérias em condições limitantes de Fe (RANA et al., 2020). Alguns fitopatógenos são dependentes de ferro e para regular o ataque desses patógenos as bactérias produtoras de sideróforos são utilizadas como agentes de biocontrole. Os sideróforos atuam através do sequestro de Fe, regulando a concentração do elemento e fazendo com que o mesmo não esteja disponível para o crescimento dos fitopatógenos (MORALES-CEDEÑO et al., 2021).

Os fitohormônios são moléculas sinalizadoras produzidas pelas plantas e participam de inúmeros processos na fisiologia vegetal. Os hormônios vegetais são classificados de acordo com sua resposta fisiológica e composição estrutural (STIRK; STADEN, 2020). As auxinas,

por exemplo, atuam na célula vegetal nos processos de alongamento, divisão e diferenciação. O AIA (ácido indol-3-acétco) é a auxina mais importante sendo responsável por auxiliar as plantas em vários processos ao longo do seu desenvolvimento e tem como precursor o Ltriptofano (KUDOYAROVA et al., 2019).

O etileno é um fitohormônio responsável pelo crescimento e desenvolvimento das plantas e amadurecimento dos frutos. Esse hormônio vegetal está presente em quase todas as partes das plantas e tem sua produção estimulada em condições de estresse (OROZCO-MESQUITA et al., 2019). O ACC deaminase (1-aminociclopropano-1-carboxilato) é precursor do etileno e a enzima é responsável por transformar o ACC em amônia e α -cetobutirato. A produção de ACC deaminase é mais um dos mecanismos desenvolvidos pelas BPCP com o objetivo de reduzir os teores de etileno na planta sob condições de estresse (KHATOON et al., 2020).

As BPCP por meio de mecanismos diretos e indiretos são capazes de garantir o rendimento e produtividade das culturas, melhorar a saúde do solo e, assim, assegurar uma agricultura sustentável (RANA et al., 2020). Esses micro-organismos têm sido utilizados em solos contaminados com metais pesados com a proposta de aumentar a biomassa vegetal, hiperacumular os metais na parte aérea, podendo ser realizada também a fitoextração (WANG et al., 2019) e adsorção de metais mantendo os mecanismos de ação de crescimento vegetal sob condição de estresse (KE et al., 2021). As BPCP têm sido utilizadas para melhorar a absorção de nutrientes e reduzir a utilização de fertilizantes inorgânicos no cultivo de milho, sorgo, soja, trigo etc (AQUINO et al., 2021; HUSSAIN et al., 2020; KUMAWAT et al., 2022; MOREIRA et al., 2020), como agentes de biocontrole ativando o sistema de defesa das plantas e protegendo contra o ataque de fitopatógenos no cultivo de pimenta-do-reino (LAU et al., 2020). Além disso, trabalhos realizados por Araújo et al. (2020; 2023) destacaram a importância do consórcio microbiano e relataram o potencial de Streptomyces sp. e Arthrobacter sp. BPCP, em aliviar o estresse hídrico no milho em condições de casa de vegetação e campo, respectivamente. Esses relatos comprovam a sinergia existente entre as BPCP e a importância de combinar mais de uma cepa microbiana a fim de obter bons resultados aproveitando o potencial de cada microorganismo (GARCIA; NOGUEIRA HUNGRIA, 2021).

Diante do exposto, a nossa hipótese é que os solos da Terra Preta da Amazônia abrigam bactérias com elevado potencial e ampla diversidade biotecnológica, apresentando mecanismos de promoção de crescimento de plantas como a solubilização de fosfato, a fixação biológica de nitrogênio, produção de AIA, ACC deaminase e sideróforos. Desta forma, o trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar morfologicamente bactérias de Terra Preta da Amazônia e avaliar *in vitro* o potencial biotecnológico dos isolados obtidos através de mecanismos de promoção de crescimento.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Área de estudo e coleta de solo

As amostras de solo foram coletadas no sítio arqueológico Jabuti, localizado no município de Bragança, no estado do Pará, Brasil (46°40'19.8" W; 0°55'39.5" S) (Figura 1). A área de coleta encontra-se dentro da Reserva Extrativista (RESEX) Marinha Caeté-Taperaçu, em um campo salino à margem esquerda do rio Caeté, distante 240 km da cidade de Belém e 36 km do litoral. O sítio Jabuti foi registrado em 2008 e é caracterizado pela presença de solos do tipo Terra Preta Arqueológica e fragmentos cerâmicos em superfície e profundidade. A datação por C₁₄ indica que o sítio foi ocupado há pelo menos 2.900 anos BP (SILVEIRA et al., 2011).





A região de Bragança é caracterizada pelo relevo de planícies elevadas, com a presença de rochas sedimentares. O clima da região é do tipo Aw de acordo com a classificação de Köppen, com temperatura média de 25 °C e precipitação variando entre 2.500 a 3.000 mm

Fonte: Google Earth.

(SOUZA et al., 2016). A vegetação é composta por florestas secundárias e capoeira, predominando palmeiras, *Orbignya oleífera* (babaçu) e *Maximiliana regia* (inajá) Silveira et al. (2011). De acordo com o Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (SiBCS), o solo foi classificado como Gleissolo apresentando a sequência de horizontes A-Cg (SOUZA et al., 2013).

A coleta de solo foi realizada em uma trincheira de dimensões 1,0 x 1,0 x 1,0 m (L x P x A). A trincheira foi limpa e uma das laterais foi desbastada em aproximadamente 20 a 30 cm para a remoção do efeito de borda sobre a microbiota presente no solo. As amostras foram coletadas em um perfil com as seguintes dimensões 60 x 70 cm (L x A), onde foi possível observar a presença de três horizontes. O horizonte A (HA) com profundidade de aproximadamente 30 cm é composto por Terra Preta da Amazônia (TPA), o horizonte B (HB) é um horizonte de transição entre a TPA e o solo de origem com profundidade aproximada até 40 cm e, por fim, o horizonte C (HC) que é mais argiloso e vai até a base da trincheira.





Fita métrica auxiliando nas medidas da profundidade do perfil e dos horizontes. Foto da autora.

Para a coleta das amostras foram utilizados tubos de PVC de 100 mm de diâmetro por 100 mm de comprimento. Os tubos foram inseridos lateralmente no perfil do solo com a ajuda de uma marreta de borracha e o solo da seção foi transferido para um saco plástico estéril. Foram coletadas cinco repetições, em três diferentes profundidades, sendo as amostras identificadas como: HA (R1, R2, R3, R4 e R5) – Terra Preta; HB (R1, R2, R3, R4 e R5) – Perfil intermediário e; HC (R1, R2, R3, R4 e R5) – Solo de origem. No momento da coleta a temperatura ambiente era 30 °C e a temperatura do solo foi 28 °C.

Amostras de solo adjacente (ADJ), não antropogênico, foram coletadas na borda da mata, distante da área de TPA. Um trado holandês foi utilizado para a retirada de amostras no horizonte superficial (0-20cm), em 05 pontos equidistantes em 1 metro em um transecto linear. As amostras foram identificadas como: ADJ (R1, R2, R3, R4, R5).

Todas as amostras coletadas foram homogeneizadas e aproximadamente 50g foram imediatamente transferidos para tubos plásticos do tipo Falcon (50 mL) estéreis, para a posterior extração de DNA e proteínas. Os tubos foram mantidos em gelo durante o período da coleta e transporte, sendo estocados em freezer a -80°C até a extração de DNA.

Figura 3. Coleta das amostras de Terra Preta da Amazônia no estado do Pará



A. Tubos de PVC inseridos no perfil para a coleta dos solos. B. Perfil após a coleta de solo nos horizontes C e B. Foto da autora.

3.2.2 Caracterização físico-química do solo

As amostras de solo foram caracterizadas de acordo com a EMBRAPA (2017). O solo foi seco ao ar, tamisado em peneira com malha de 2 mm para obtenção da terra fina seca ao ar (TFSA), utilizada para as análises químico-físicas.

O pH foi determinado em água (H₂O) e cloreto de cálcio (CaCl₂) na proporção (1:2,5) solo:líquido. Os teores de cátions trocáveis cálcio (Ca²⁺), magnésio (Mg²⁺) e alumínio (Al³⁺) foram extraídos com KCl (1 mol L⁻¹), Ca²⁺ e Mg²⁺ foram determinados por espectrofotometria

de absorção atômica e Al³⁺ por titulação com solução de NaOH 0,025 mol L⁻¹. O potássio (K⁺) e o sódio (Na⁺) foram extraídos com Mehlich⁻¹ (H₂SO₄ 0,025 mol L⁻¹ e HCl 0,05 mol L⁻¹) e determinados por espectrofotometria de chama. O fósforo disponível (P_{disponível}) foi extraído por Mehlich⁻¹ e determinado por colorimetria.

A acidez potencial (H+Al) foi extraída com acetato de cálcio [(CH₃COO)₂Ca.H₂O] a pH 7,0 e dosada por titulação com solução de NaOH 0,025 mol L⁻¹. Com os resultados obtidos, foram calculados a soma de bases (S), saturação por bases (V), saturação por alumínio (m) e capacidade de troca de cátions (CTC) efetiva (T) e potencial (t).

Para obtenção do teor de enxofre (S) foi realizado o ataque da amostra com ácido clorídrico (HCl) 1:1, seguida da precipitação com cloreto de bário (BaCl₂), calcinação do sulfato de bário (BaSO₄) e determinação gravimétrica do precipitado. A extração de cobre (Cu) Zinco (Zn), Ferro (Fe) e Manganês (Mn) foi realizada a partir da solução de Mehlich⁻¹ e a determinação por espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). Para a extração de boro (B) foi utilizada a solução extratora de cloreto de bário (BaCl₂), a amostra foi aquecida no micro-ondas e em seguida filtrada para posterior leitura através de espectrometria de emissão atômica em plasma (ICP-AES) Raij et al. (2001).

A matéria orgânica (MO) foi determinada a partir da submissão da amostra ao processo de combustão com aquecimento programado e perda de massa pela incineração em mufla. O teor de MO foi quantificado pela diferença entre a massa do solo seco em estufa e a massa do resíduo obtido após a incineração em mufla.

A análise granulométrica do solo foi realizada pelo método de dispersão mecânica, onde foi realizada a estabilização da amostra em solução dispersante por meio de agitador, seguida da separação das frações areia, argila e silte por meio de pesagem após secagem em estufa.

Para as análises de glomalina no solo e isolamento de bactérias foram utilizadas apenas as amostras do solo de Terra Preta da Amazônia.

3.2.3 Glomalina no solo

A extração e quantificação da glomalina presente na TFSA foi baseada nos procedimentos descritos por Wright e Upadhyaya (1996) e Wright e Upadhyaya (1998), utilizando o método de Bradford. A extração da fração glomalina facilmente extraível por Bradford foi realizada a partir de 1 g de TFSA em 8 mL de citrato de sódio (Na₃C₆H₅O₇) [20 Mm (pH 7,0)], com digestão única em autoclave à 121 °C por 30 min. A determinação foi realizada por colorimetria, e a partir de curva padrão (y = 0,1078x + 0,4316; R² = 0,9988), foram obtidos os teores em µg de glomalina por g⁻¹ de solo. Já a fração glomalina total, por

meio de 10 digestões consecutivas em autoclave à 121 °C, utilizando o citrato de sódio como extrator [50 Mm (pH 8,0)], sob as mesmas condições para digestão. A determinação também foi realizada por colorimetria, e a partir de curva padrão (y = 0,1082x + 0,2521; $R^2 = 0,99$), foram obtidos os teores em µg glomalina g⁻¹ solo (Figura 4).





A. Gradiente de cores formado no extrato obtido após a extração da glomalina facilmente extraível dos horizontes A, B e C (da esquerda para a direita), HA, HB e HC do perfil de Terra Preta da Amazônia. **B**. Curva para leitura das amostras de glomalina, formada por um gradiente de cor que vai do castanho claro ao azul escuro (da esquerda para a direita). Foto da autora.

3.2.4 Isolamento de bactérias com potencial biotecnológico

Para a obtenção dos isolados bacterianos foram utilizadas as cinco repetições do perfil de Terra Preta da Amazônia, (5 amostras do horizonte A, 5 amostras do horizonte B e 5 amostras do horizonte C), totalizando 15 amostras. O isolamento foi realizado a partir de 10 g de cada repetição. As amostras foram pesadas e adicionadas a erlenmeyers de 125 mL contendo 90 mL de solução salina (0,85 % NaCl) previamente esterilizada. Em seguida foram tampados, mantidos sob agitação durante 30 minutos e, posteriormente, foram retiradas as alíquotas para realizar as diluições seriadas.

As amostras foram diluídas serialmente (10⁻², 10⁻³ e 10⁻⁴) em solução salina e em seguida foram retiradas alíquotas de 100 mL das diluições e espalhadas em placas de Petri, em triplicata, com auxílio de uma alça de Drigalski, contendo o meio de cultura King B (Apêndice A) (KING; WARD; RANEY, 1954). As placas foram incubadas a 28 °C, durante 72 horas, em estufa bacteriológica (BOD).

Após o crescimento dos isolados foi determinada a população de Unidades Formadoras de Colônia por grama de solo (UFC.g⁻¹). As colônias foram selecionadas de forma aleatória, observando principalmente diferenças morfológicas e estriadas em placa de Petri contendo o

mesmo meio de cultura para a sua purificação, sendo então incubadas na BOD com tempo de crescimento variando entre 1 e 5 dias.

3.2.5 Caracterização fenotípica e armazenamento dos isolados bacterianos

Depois de confirmada a pureza das colônias, os isolados foram caracterizados quanto ao tempo de crescimento (rápido – 24 horas; intermediário – 48 horas; lento – 72 horas; muito lento – > 72 horas); tamanho da colônia medido com o auxílio de um paquímetro (variando entre < 1 mm e > 5 mm); forma da colônia (circular ou irregular); transparência da colônia (opaca – ausência de brilho; translúcida – permite a passagem da luz através da placa; e transparente – além de permitir a passagem da luz é possível perceber o que tem do outro lado da placa); cor das colônias (creme, branca, amarela, laranja, rosa ou transparente); presença de muco (sim ou não); quantidade de muco (muito, intermediária ou pouco); tipo e muco (viscoso ou não produziu) e elevação (muito, intermediária ou leve) (VINCENT, 1970; HUNGRIA; ARAÚJO, 1994).

Os isolados bacterianos foram estocados em tubos de 2 mL contendo 1 mL de meio de cultura King B líquido adicionado de 25 % de glicerina e armazenados em freezer -20 °C, em triplicata. Os dendrogramas de similaridade (100 %) foram gerados para todos os três horizontes, onde os dados de caracterização fenotípica obtidos foram utilizados para formação de uma matriz binária (1 – positivo e 0 – negativo). O método de agrupamento utilizado foi UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), com base no índice de Jaccard, utilizando o PAST (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).



Figura 5. Isolados obtidos de um perfil de Terra Preta da Amazônia do Pará

Diversidade morfológica dos isolados da Terra Preta da Amazônia. Foto da autora.

3.2.6 Mecanismos de promoção de crescimento de plantas

3.2.6.1 Solubilização de fosfato de cálcio

Os isolados foram inoculados em triplicata retirando-se uma porção de uma colônia isolada e realizando um leve toque no meio de cultura com auxílio da alça de platina. A formação do halo translúcido em torno da colônia indica a solubilização do fosfato. O halo foi medido com auxílio do paquímetro possibilitando calcular o índice de solubilização (IS) (BERRAQUERO et al., 1976). Com base nos índices de solubilização, os isolados foram classificados como isolados com baixa (IS < 2), média (2 < IS < 4) e alta (IS > 4) capacidade de solubilização (HARA; OLIVEIRA, 2004).

$$IS = \frac{Di\hat{a}metro_{Halo}}{Di\hat{a}metro_{Col\hat{o}nia}}$$

A seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato de cálcio dibásico foi realizada segundo a metodologia descrita por Verma; Ladha; Tripathi (2001) com modificações (Apêndice B). Os isolados foram inoculados em meio de cultura sólido, incubados a 28 °C por 15 dias e nas colônias que apresentaram a formação do halo foram realizadas as medidas do diâmetro do halo e diâmetro da colônia para obtenção do IS.



Figura 6. Bactérias solubilizadoras de fosfato de cálcio da Terra Preta da Amazônia do Pará

A e B presença de halo em torno da colônia indica a solubilização de fosfato. C Diâmetro do halo (seta azul) e diâmetro da colônia (seta vermelha). Foto da autora.

3.2.6.2 Produção de ácido indol-acético (AIA)

Os isolados foram crescidos no escuro por 48 horas a 30 °C em meio Tryptone Soya Broth – TSB 10 % (Apêndice C), suplementado com L-triptofano (5 Mm), sob agitação constante de 150 rpm. Após o período de incubação foi retirada uma alíquota de 1,5 mL, adicionada em eppendorf de 2 mL e centrifugada a 12.000 rpm, durante 5 minutos. Em seguida 1 mL do sobrenadante foi transferido para copos descartáveis de 50 mL, no qual foram adicionados 4 mL do reagente de Salkowski (1 mL FeCl₃ 0,5 mol.L⁻¹, 50 mL H₂O, 30 mL H₂SO₄) (GORGON; WEBER, 1951). As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 15 minutos na ausência de luz e avaliadas posteriormente utilizando espectrofotômetro a 530 nm.

A produção de AIA foi confirmada pela coloração rosa das amostras (KUSS et al., 2007). A concentração de compostos indólicos foi estimada por meio de uma curva padrão, previamente preparada a partir de meio de cultura estéril, não inoculado, com quantidades conhecidas de AIA: 0; 5; 20; 40; 60 e 80 μ g.mL⁻¹, de acordo com a equação Y= 0,0106 x + 0,0295 (R² = 0,9937). O ensaio foi realizado em triplicata. A produção de AIA foi classificada em: baixa < 1 μ g.mL⁻¹; média 1 – 11 μ g.mL⁻¹; alta 11 – 50 μ g.mL⁻¹ e elevada > 50 μ g.mL⁻¹ (ARAÚJO et al., 2020).



Figura 7. Curva para leitura de ácido indol-acético (AIA)

Formação de um gradiente de cores correspondente às concentrações de AIA, da esquerda (amarelo claro) para a direita (rosa pink) as seguintes concentrações: 0; 5; 20; 40; 60 e 80 µg.mL⁻¹. Foto da autora.

3.2.6.3 Produção de sideróforos

A capacidade de produção de sideróforos foi avaliada utilizando o método descrito por Schwyn e Neilands (1987). Os isolados foram inoculados em tubos falcon de 15 mL contendo 5 mL do meio de cultura King B líquido (Apêndice D) e mantidos durante 7 dias à 28 °C, sob agitação constante (150 rpm). Após esse período, foi adicionado 1 mL do inóculo em eppendorf de 1,5 mL e centrifugados a 9.500 g durante 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 1 mL do sobrenadante de cada cultura na cubeta, além de 1 mL do reagente cromo azurol S – CAS (Apêndice E). As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 30 minutos na ausência de luz e avaliadas posteriormente utilizando espectrofotômetro à 630 nm.

A produção de sideróforos pelos isolados foi confirmada pela coloração alaranjada ou amarelada das amostras. O meio de cultura King B sem inóculo, foi utilizado como controle negativo. Foi utilizado o meio de cultura King B devido a sua ausência de ferro (Fe) que induz os isolados a produzir sideróforos. Desta forma, os sideróforos produzidos sequestram e complexam o Fe presente na solução CAS, liberando o corante, o que resulta na mudança de coloração do meio de cultura para laranja ou amarelo.



Figura 8. Produção de sideróforo confirmada pela coloração alaranjada

Demonstrativo da diferença de coloração entre isolados não produtores de sideróforos (coloração azul) e produtor de sideróforos (coloração laranja). Foto da autora.

Devido ao grande número de isolados obtidos, para o teste de fixação biológica de nitrogênio foram selecionados 166 isolados que produziram pelo menos um mecanismo testado anteriormente.

3.2.6.4 Fixação biológica de nitrogênio em meio semissólido

Os isolados foram crescidos em meio TSB 100 % (Apêndice C) por 48 horas sob agitação de 150 rpm a 28 °C (temperatura ambiente). Em seguida, foi retirada uma alíquota de 1 mL do inóculo, transferido para tubo de 2 mL e centrifugados a 5.000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente para não perder o pellet. O pellet foi ressuspendido em 1 mL de solução salina 85 % para lavagem das células e remoção do nitrogênio do meio, esse procedimento foi repetido pelo menos duas vezes.

Após a lavagem, foi realizada a inoculação de 100 mL da suspensão em frascos de penicilina, em triplicata, contendo 5 mL do meio de cultura JNFB semi-sólido (Apêndice F) (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995). Os frascos foram incubados a 28 °C durante 3 - 7 dias. Foram considerados positivos para fixação biológica de nitrogênio os isolados que formaram a película e os que não formaram negativos.

Figura 9. Isolados inoculados em meio semi-sólido livre de nitrogênio com possível potencial para fixar nitrogênio de forma assimbiótica



A. Repetições do isolado 395 comparado com o branco. **B** (meio de cultura sem inóculo). Formação de película, indicando a possível capacidade do isolado fixar nitrogênio, e modificação do pH do meio (alcalino). **C** Formação de película, indicando a possível capacidade do isolado fixar nitrogênio, sem modificação do pH do meio (neutro). Foto da autora.

Para as análises moleculares os isolados foram selecionados adotando os seguintes critérios: todos os que produziram sideróforos, produção de AIA média a elevada e solubilização de fosfato média ou os que apresentaram baixa solubilização, mas produziram outro mecanismo. Sendo assim, foram selecionados 52 isolados.

3.2.7 Extração de DNA dos isolados

Os isolados foram crescidos em 5,0 mL do meio de cultura Tryptic Soy Broth (TSB) e agitados a 150 rpm por 72 h em 28 °C. Em seguida, 2 mL de suspensão bacteriana foram centrifugados a 14.000 g por 10 minutos, descartou-se o sobrenadante cuidadosamente, e o pellet formado foi utilizado para extração do DNA através do kit PureLink Microbiome DNA Purification (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos) de acordo com as recomendações do fabricante. A integridade do DNA foi analisada a partir de uma alíquota de 4 µL através de eletroforese em gel de agarose 0,5% em tampão TAE 1x (Tris, Ácido acético, EDTA) adicionado ao corante Sybr® Green (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos). O gel foi submetido a um campo eletroforético de 100 volts por 30 min. Utilizou-se o 100 pb Plus DNA Ladder (Invitrogen), como padrão molecular. A imagem do gel foi visualizada e capturada sob luz ultravioleta em um transluminador UV E-BOX VX2.

3.2.8 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

Os isolados produtores de ACC e fixadores de nitrogênio foram identificados por meio da utilização da técnica qPCR, sendo considerados positivos os que amplificaram para o gene alvo e negativos os que não amplificaram. As reações foram realizadas em duplicata, no volume final de 10 μ L contendo 5 μ L do kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, USA), 1 μ L de cada primer, 2 μ L de H₂O livre de nucleases e 1 μ L de DNA, usando o Rotor-Gene 3000 thermal cycler (Corbett Life Science, Australia). Os iniciadores e as condições das reações estão descritos na Tabela 1. Um controle negativo foi adicionado em todas as quantificações visando o monitoramento de contaminações.

Tabela 1. Primers e condições de ciclagem utilizados para amplificar os genes alvo qPCR

Gene Alvo	Primer	Sequência	Condições para ciclagem	
<i>nif</i> H (diazotróficos)	FGPH19 ¹ POLR ²	5' TACGGCAARGGTGGNATHG 3' 5' ATSGCCATCATYTCRCCGGA 3'	95 ℃ 5 min, 1 ciclo; 94 ℃ 1 min, 57 ℃ 45 s, 72 ℃ 1 min, 30 ciclos; 72 ℃ 7 min, 1 ciclo	
<i>acd</i> S (ACC deaminase)	acdSF5 ³ acdSR8 ³	5' TGCCAAGCGTGAAGACTGC 3' 5' GGGTCTGGTTCGACTGGAT 3'	95 ℃ 3 min, 1 ciclo; 95 ℃ 30 s, 58 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 40 ciclos; 72 ℃ 7 min, 1 ciclo	

¹Simonet et al. (1991); ²Poly, Monrozier e Bally (2001); ³Jaya et al. (2019)

3.2.9 Amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA

Para a amplificação parcial do gene 16S rRNA foram utilizados os primers 27F (AGAGTTTGACCTGGCTCAG) e 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) (LANE, 1991). A reação de amplificação com um volume final de 50 μ L foi: 2 μ L de DNA, 1,5 μ L de MgCl₂ (50 mM), 5,0 μ L tampão 10 x para PCR, 1,0 μ L dNTP's (10 mM), 2,0 μ L de cada primer (10 mM), 0,6 μ L de Taq DNA Polimerase (5 U/ μ L) e 35,9 μ L de água Mili-Q para completar o volume final. A reação de amplificação foi realizada em termociclador, nas seguintes condições: desnaturação inicial de 94 °C, por 5 min, 35 ciclos de desnaturação a 94 °C, por 40 segundos, anelamento a 55 °C, por 40 segundos, extensão a 72 °C, por 1 min e 30 segundos e uma extensão final de 72 °C, por 7 min. Os produtos amplificados foram corridos em tampão TAE 1,0 x a 100

v durante 30 min em gel de agarose 0,5 %, corados com Sybr® Green (Life Technologies, Carlsbad, Estados Unidos) e visualizados sob luz UV em um transluminador UV E-BOX VX2.

Os produtos da PCR foram enviados para Macrogen Laboratory, Coréia do Sul, para purificação e sequenciamento. As sequências obtidas foram comparadas com o banco de dados do EzBioCloud 16S-based ID (YOON et al., 2017). As sequências alinhadas foram utilizadas para análise filogenética pelo método Neighbour-Joining, usando Kimura-2 parâmetros (KIMURA, 1980) pelo programa MEGA 6 (TAMURA et al., 2013), aplicando um bootstrap com um mínimo de 1.000 replicações.

3.2.10 Análise estatística e interpretação dos resultados

As variáveis quantitativas foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas utilizando-se o teste Skott Knott a 5 % de probabilidade, por meio do programa SISVAR versão 5.1.

Os isolados avaliados para os mecanismos de produção de AIA e solubilização de fosfato de cálcio, foram agrupados utilizando o programa PAST3, as médias obtidas pelos representantes dos grupos formados, foram submetidos ao teste Skott Knott a 5 % de probabilidade, por meio do programa SISVAR versão 5.1.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Atributos físicos e químicos do solo

Os teores de areia grossa, argila e silte encontrados nos horizontes A, B e C do perfil de TPA podem ser vistos na Figura 10. Os horizontes A e B foram classificados possuindo textura média, com 687,2 g.kg⁻¹ e 703,4 g.kg⁻¹ de areia, respectivamente. Enquanto a textura do horizonte C foi classificada como argilosa, apresentando 416 g.kg⁻¹ de argila. O solo adjacente foi classificado como arenoso com 903 g.kg⁻¹ de areia.

Figura 10. Análise granulométrica do perfil de Terra Preta da Amazônia e solo adjacente do Pará



HA – horizonte A; HB – horizonte B e HC – horizonte C; ADJ – solo adjacente. Os valores correspondem a média de cinco repetições e as barras correspondem ao desvio padrão da média.

O perfil de solo antropogênico classificado como Gleissolo apresentou mudanças significativas nas propriedades químicas entre os horizontes (Tabela 2). O pH é uma variável utilizada para determinar o potencial de acidez do solo e foi classificado como extremamente ácido (< 4,5) nos horizontes A, B e C da TPA, assim como, no solo adjacente, não havendo diferença estatística significativa entre eles; o que resultou em um nível elevado de alumínio trocável e saturação por alumínio (m). Os solos com valores de pH abaixo de 5,0 geralmente apresentam problemas com toxidez causada pelo alumínio. De modo geral, foi possível verificar que elementos como P, K⁺, Mg²⁺, Al³⁺, Cu, Zn, Na⁺ e Fe aumentaram em profundidade apresentando as maiores concentrações no horizonte C.

	Unidades	НА	HB	НС	ADJ
pH H ₂ O	-	4,36	4,42	4,3	4,28
pH CaCl ₂	-	3,76	3,68	3,4	3,28
Р	mg.dm ⁻³	92,82	118,42	142,64	1,8
K ⁺	mg.dm ⁻³	29	22,64	37,36	12,2
S	mg.dm ⁻³	3,6	1,6	2	0,6
Ca ²⁺	cmol _c .dm ⁻³	0,098	0,09	0,094	0,046
Mg^{2+}	cmol _c .dm ⁻³	0,168	0,204	0,396	0,082
A1 ³⁺	cmol _c .dm ⁻³	3,874	5,132	11,64	1,136
H+A1	cmol _c .dm ⁻³	11,44	8,72	10,6	6,14
МО	%	4,14	1,488	0,346	2,062
В	mg.dm ⁻³	0,382	0,298	0,368	0,228
Cu	mg.dm ⁻³	0,94	0,94	1,52	0,1
Fe	mg.dm ⁻³	79,8	175	469,4	39,2
Mn	mg.dm ⁻³	1,06	0,84	0,66	0,52
Zn	mg.dm ⁻³	0,08	0,12	3,2	0,22
Na^+	mg.dm ⁻³	52,62	50,18	61,4	29,5
SB	cmol _c .dm ⁻³	0,36	0,36	0,58	0,16
Т	cmol _c .dm ⁻³	11,78	9,08	11,2	6,32
t	cmol _c .dm ⁻³	4,22	5,48	12,22	1,3
V	%	2,8	4	6	2,6
m	%	91,80	93,80	95,4	87,4

Tabela 2. Caracterização química de um perfil de Terra Preta da Amazônia e solo adjacente do Pará

HA - horizonte A; HB - horizonte B e HC - horizonte C; ADJ - solo adjacente. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05).

A acidez trocável (Al³⁺) diferiu (p < 0,05) entre os horizontes de TPA e solo ADJ, sendo mais elevada no HC onde o pH foi menor. Quanto a acidez potencial (H+Al) foi mais elevada nos horizontes de TPA, sendo HA e HC superior ao solo ADJ, enquanto HB foi estatisticamente igual ao solo de referência. Os valores de fósforo foram mais elevados nos horizontes de TPA, aumentando em profundidade. O horizonte C apresentou o maior teor de P (142,64 mg.dm⁻³) sendo superior a todos os outros, inclusive ao solo ADJ que apresentou os menores teores

(Figura 11). O potássio foi maior nos horizontes de TPA apresentando diferença estatística entre os horizontes e o solo adjacente, sendo encontrado no HC o maior teor (37,36 mg.dm⁻³). O cálcio não apresentou diferença estatística em nenhum dos solos avaliados, enquanto o magnésio foi superior nos horizontes antrópicos, sendo o maior teor (0,369 cmol_c.dm⁻³) encontrado no HC.

Figura 11. Concentração de fósforo (mg.dm⁻³) do perfil de Terra Preta da Amazônia e solo adjacente do Pará



HA – horizonte A; HB – horizonte B e HC – horizonte C; ADJ – solo adjacente. Os valores correspondem a média de cinco repetições, barras correspondem ao desvio padrão de média.

A matéria orgânica (MO), conforme esperado, apresentou maior valor no horizonte A, diferindo (p < 0,05) estatisticamente do HC e HB que foi igual ao solo ADJ, e diminuiu em profundidade, assim, como a acidez trocável (H+Al), cálcio, enxofre e os micronutrientes B e Mn. A soma de bases (SB), foi superior no HC, diferindo dos demais horizontes e solo ADJ. Tanto a saturação por bases (V) quanto a saturação por alumínio (m) são influenciados pela acidez trocável, de modo que, valores elevados de alumínio refletem em saturação por bases reduzida e saturação por alumínio elevada. O HC apresentou a maior porcentagem de V %, sendo quase 3 vezes maior do que no HA e solo ADJ. Quanto a m %, os horizontes de TPA diferiram estatisticamente do solo ADJ, apresentando as porcentagens de 91,80 %, 93,80 % e 95,4 % os horizontes A, B e C, respectivamente. Os maiores valores de T foram encontrados nos horizontes de TPA, sendo os valores do HA e HC quase 2 vezes maiores do que no solo ADJ.

O boro não apresentou diferença estatística entre os solos avaliados. O cobre, o ferro e o zinco apresentaram os maiores teores 1,52 mg.dm⁻³; 469,4 mg.dm⁻³ e 3,2 mg.dm⁻³, respectivamente, no HC, sendo estatisticamente diferente dos demais horizonte e solo ADJ. O manganês foi estatisticamente diferente no HA, apresentando os maiores teores (1,06 mg.dm⁻³) em relação aos demais horizontes e ADJ. O perfil de TPA apresentou valores elevados de sódio em todos os horizontes, sendo estatisticamente diferente do solo adjacente que apresentou o menor valor (29,5 mg.dm⁻³).

De modo geral, em todos nos horizontes de Terra Preta da Amazônia e solo adjacente, a saturação por bases foi inferior a 50 %, sendo os solos considerados distróficos, enquanto a saturação por alumínio foi superior a 50 % em todos eles, indicando toxicidade alta, o que é considerado um fator limitante no desenvolvimento do sistema radicular das culturas.

3.3.2 Glomalina no solo

A partir do fracionamento da glomalina obteve-se a glomalina facilmente extraível e a glomalina total. Assim, os resultados obtidos mostraram que tanto a glomalina facilmente extraível quanto a glomalina total apresentaram os maiores valores no horizonte A (0,5099 e $0,3314 \ \mu g$ glomalina g⁻¹ solo, respectivamente) diferindo estatisticamente (p < 0,05) dos horizontes B e C.

Figura 12. Quantificação da glomalina facilmente extraível por Bradford e da glomalina total nos diferentes horizontes em um perfil de Terra Preta da Amazônia do Pará



HA – horizonte A; HB – horizonte B e HC – horizonte C. Valores médios de cinco repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott (p < 0.05).

3.3.3 Isolamento e contagem das unidades formadoras de colônias das amostras do perfil de solo de Terra Preta da Amazônia do Pará

Os valores de UFC, expressos em Log_{10} , indicam que a população de bactérias no horizonte B foi superior em relação aos horizontes A e C. De forma geral, os valores de UFC variaram entre 2,03 x 10⁶ (HC); 6,93 x 10⁶ (HA) e 2,43 x 10⁷ (HB) Figura (13).

Figura 13. Contagem da população bacteriana cultivável de amostras de Terra Preta da Amazônia do Pará



HA - horizonte A; HB - horizonte B e HC - horizonte C.

3.3.4 Caracterização fenotípica e armazenamento dos isolados bacterianos

Um total de 466 isolados foram caracterizados: 149 isolados do horizonte A; 194 isolados do horizonte B; 123 isolados do horizonte C. Os isolados foram agrupados por horizonte de acordo com as características fenotípicas e distribuídos em grupos distintos. Em um coeficiente de similaridade de 100 % foram gerados 77 grupos no horizonte A (Apêndice G), 115 grupos no horizonte B (Apêndice H) e 73 grupos no horizonte C (Apêndice I).

No horizonte A, 88,6 % dos isolados apresentaram crescimento rápido e 11,4 % apresentaram crescimento intermediário. Quanto à forma das colônias, 54,4 % apresentaram forma circular e 45,6 % forma irregular. A maior parte das colônias eram secas sendo que 81,2 % não produziram muco e apenas 18,8 % produziram muco. Em relação a elevação das colônias, 73,8 % apresentaram elevação leve, 23,5 % elevação intermediária e somente 2,7% das colônias eram muito elevadas. Os isolados apresentaram uma variedade de cores,

distribuídas entre colônias creme (43 %), branca (43,6 %), amarela (7,4 %), laranja (2,0 %) e rosa (4,0 %) (Figura 14).



Figura 14. Caracterização fenotípica dos isolados bacterianos obtidos das amostras do horizonte A de Terra Preta da Amazônia do Pará

No horizonte B, 69,6 % dos isolados apresentaram crescimento rápido, 18 % crescimento intermediário e 12,4 % crescimento lento. Quanto a forma, 69,6 % das colônias eram circulares e 30,4 % apresentavam forma irregular. Assim como no HA, a maior parte das colônias, representadas pela porcentagem de 70,1 %, eram secas e 29,9 % produziram muco. Quanto à elevação das colônias, 76,3 % apresentaram elevação leve, 21,1 % intermediária e 2,6 % eram muito elevadas. Dentre a variedade de cores apresentada pelos isolados 38,7 % das colônias eram creme, 32 % brancas, 20,1 % amarelas, 7,2 % laranjas e 2,1 % rosas (Figura 15).


Figura 15. Caracterização fenotípica dos isolados bacterianos obtidos das amostras do horizonte B de Terra Preta da Amazônia do Pará

Enquanto no horizonte C, 80,5 % dos isolados apresentaram crescimento rápido, 17,1 % intermediário, 1,6 % lento e 0,8 % muito lento. A maioria das colônias, 98,4 %, apresentou forma circular e apenas 1,6 % apresentou forma irregular. Quanto à produção de muco, 82,1 % não produziram muco, enquanto 17,9 % produziram muco. Assim como nos horizontes A e B, a maioria das colônias eram cremes (29,3 %), seguidas das colônias brancas (24,4 %), amarelas (17,1 %), laranjas (13,8 %), rosas (15,4 %), respectivamente (Figura 16).

O apêndice J apresenta a comparação das características morfofisiológicas avaliadas em todos os perfis de TPA. De maneira genérica, as bactérias isoladas da TPA apresentaram crescimento rápido (24 horas); formato da colônia circular, com ausência de muco, elevação leve e coloração creme ou branca.



Figura 16. Caracterização fenotípica dos isolados bacterianos obtidos das amostras do horizonte C de Terra Preta da Amazônia do Pará

3.3.5 Mecanismos de promoção de crescimento de plantas

3.3.5.1 Solubilização de fosfato de cálcio

Dos 149 isolados obtidos do horizonte A, 23 % (34) foram capazes de formar halo de solubilização de fosfato de cálcio. Sendo que, 21 % (31) apresentaram índice de solubilização (IS) baixo, 2 % (3) IS médio e nenhum isolado foi capaz de apresentar IS alto (Figura 17).

Figura 17. Frequência da solubilização de fosfato de cálcio dos isolados obtidos do horizonte A de um perfil de Terra Preta da Amazônia do Pará



De acordo com o IS obtido: (-) não solubiliza; IS < 2 baixo; IS 2 - 4 médio e IS > 4 alto.

Os IS obtidos pelos isolados que apresentaram resposta positiva para a solubilização de fosfato (34) variaram entre 1,06 e 2,13. Dentre os isolados do HA, os que produziram os maiores IS foram o 88 e 107, apresentando IS acima de 2,0 e por isso foram classificados dentro do grupo de média solubilização (Tabela 3).

Isolado	IS	Isolado	IS
2	1,30b	89	1,60a
4	1,20b	90	1,56a
5	1,23b	92	1,73a
9	1,20b	94	1,83a
16	1,13b	95	1,96a
19	1,10b	96	1,73a
21A	1,60a	99	1,50b
42	1,20b	102	1,60a
45	1,10b	103	1,90a
52	1,90a	104	1,93a
55	1,20b	106	1,46b
61	1,36b	107	2,10a
67	1,56b	108	1,73a
72	1,20b	112A	1,10b
81	1,46b	113A	1,10b
85	1,80a	114	1,06b
88	2,13a	138	1,30b
CV %	20,73		

Tabela 3. Isolados solubilizadores de fosfato de cálcio obtidos do horizonte A de um perfil de Terra Preta da Amazônia do Pará

De acordo com o índice de solubilização: IS < 2 baixo; IS 2 - 4 médio e IS > 4 alto. Letra minúsculas comparam a solubilização de fosfato entre os isolados obtidos no HA.

No horizonte B isolados, dos 194 obtidos aproximadamente 15 % (30) foram capazes de formar halo de solubilização de fosfato de cálcio. Sendo que, 14,9 % (29) apresentaram IS baixo, 0,5 % (1) apresentou IS médio e nenhum isolado foi capaz de apresentar IS alto (Figura 18).

Figura 18. Frequência da solubilização de fosfato de cálcio dos isolados obtidos do horizonte B de um perfil de Terra Preta da Amazônia do Pará



De acordo com o IS obtido: (-) não solubiliza; IS < 2 baixo; IS 2 - 4 médio e IS > 4 alto.

Os IS obtidos pelos isolados que apresentaram resposta positiva para a solubilização de fosfato (30) variaram entre 1,10 e 3,76. Dentre os isolados do HB, somente o 269 foi capaz de produzir IS acima de 2,0, diferindo (p < 0,05) estatisticamente dos demais, e por isso foi classificado como de média solubilização (Tabela 4).

Isolado	IS	Isolado	IS
170	1,10b	265	1,30b
175	1,63b	269	3,76a
196	1,26b	270	1,3b
199	1,20b	273	1,43b
202	1,43b	279	1,30b
204	1,20b	295	1,43b
237	1,33b	305	1,10b
238	1,26b	319	1,26b
239	1,10b	324	1,10b
242	1,26b	326	1,13b
250	1,30b	333	1,26b
251	1,33b	334	1,30b
252	1,40b	335	1,30b
253	1,30b	336	1,23b
256	1,26b	342	1,33b
CV %	29,42		

Tabela 4. Isolados solubilizadores de fosfato de cálcio obtidos do horizonte B de um perfil de Terra Preta da Amazônia do Pará

De acordo com o índice de solubilização: IS < 2 baixo; IS 2 - 4 médio e IS > 4 alto. Letra minúsculas comparam a solubilização de fosfato entre os isolados obtidos no HB.

Dos 123 isolados obtidos no horizonte C, 16 % (20) foram capazes de formar halo de solubilização de fosfato de cálcio. Sendo que, 10 % (13) e 6 % (7) apresentaram IS baixo e médio, respectivamente, e nenhum isolado foi capaz de apresentar IS alto (Figura 19).



Figura 19. Frequência da solubilização de fosfato de cálcio dos isolados obtidos no horizonte C de um perfil de Terra Preta da Amazônia do Pará

De acordo com o IS obtido: (-) não solubiliza; IS < 2 baixo; IS 2 - 4 médio e IS > 4 alto.

Os IS obtidos pelos isolados que apresentaram resposta positiva para a solubilização de fosfato variaram entre 1,20 e 3,16. Dentre os isolados do HC, os que produziram os maiores IS foram o 382; 395; 402; 405; 435; 459 e 463, diferindo (p < 0,05) dos demais isolados, apresentaram IS acima de 2,0 e por isso foram classificados dentro do grupo de média solubilização (Tabela 5).

Isolado	IS	Isolado	IS
351A	1,70b	411	1,90b
351B	1,70b	416	1,56b
360	1,70b	426	1,3b
373	1,86b	431	1,60b
382	2,03b	434	1,73b
395	2,53a	435	2,16a
396	1,80b	445	1,56b
399	1,20b	451	1,23b
402	4,46a	459	2,33a
405	3,16a	463	2,33a
CV %	23,66		

Tabela 5. Isolados solubilizadores de fosfato de cálcio obtidos do horizonte B de um perfil de Terra Preta da Amazônia do Pará

De acordo com o índice de solubilização: IS < 2 baixo; IS 2 - 4 médio e IS > 4 alto. Letra minúsculas comparam a solubilização de fosfato entre os isolados obtidos no HC.

3.3.5.2 Produção de ácido indol acético (AIA)

Dos 149 isolados obtidos no horizonte A, 23 produziram uma quantidade de AIA superior a 1,0 µg.mL⁻¹. Cerca de 35 % (8) dos isolados apresentaram produção alta de AIA, enquanto 65 % (15) produziram AIA em concentração considerada média (Figura 20).

Figura 20. Frequência da produção de AIA na presença de L-triptofano (5Mm) dos isolados obtidos do horizonte A de um perfil de Terra Preta da Amazônia do Pará



De acordo com a produção de AIA: < 1 μ g.mL⁻¹ baixa; 1 – 11 μ g.mL⁻¹ média; 11 – 50 μ g.mL⁻¹ alta e > 50 μ g.mL⁻¹ elevada.

A produção de AIA pelos isolados do horizonte A variou entre 5,36 μ g.mL⁻¹ e 34,44 μ g.mL⁻¹. Os isolados que produziram os maiores níveis de AIA foram 140; 17 e 55. A produção dos respectivos isolados foi classificada como alta, os quais diferiram estatisticamente entre si e foram superiores (p<0,05) aos demais isolados. Dentre os isolados produtores de AIA, o maior produtor foi 140, produzindo 34,44 μ g.mL⁻¹, sendo superior (p<0,05) ao 17 que produziu 21,52 μ g.mL⁻¹ e 55 que produziu 16,08 μ g.mL⁻¹. O isolado 59 teve a menor produção de AIA, classificada como média, produzindo, 5,36 μ g.mL⁻¹ (Tabela 6).

ISOLADO	AIA (µg.mL ⁻¹)	ISOLADO	AIA (µg.mL ⁻¹)
4	9,70 e	89	7,24 f
6	7,05 f	90	10,07 e
9	6,02 f	92	6.93 f
17	21,52 b	94	6,43 f
32	6,58 f	95	14,38 d
37	5,83 f	96	13,72 d
51	10,17 e	97	6,83 f
55	16,08 c	99	10,26 e
58	7,97 f	126	9,19 e
59	5,36 f	140	34,44 a
61	13,82 d	141	13,56 d
88	14,32 d		
CV %	7,51		

Tabela 6. Isolados produtores de AIA obtidos do horizonte A de um perfil de Terra Preta da Amazônia do Pará

Letra minúsculas comparam a produção de AIA entre os isolados. De acordo com a produção de AIA: < 1 μ g.mL⁻¹ baixa; 1 – 11 μ g.mL⁻¹ média; 11 – 50 μ g.mL⁻¹ alta e > 50 μ g.mL⁻¹ elevada.

No horizonte B, dos 194 isolados obtidos, 29 foram capazes de produzir uma quantidade de AIA superior a 1,0 μ g.mL⁻¹. Sendo que, 55 % (16) dos isolados apresentaram produção de AIA considerada média e 45 % (13) produziram uma quantidade de AIA considerada alta (Figura 21).

Figura 21. Frequência da produção de AIA na presença de L-triptofano (5Mm) dos isolados obtidos do horizonte B de um perfil de Terra Preta da Amazônia do Pará



De acordo com a produção de AIA: < 1 μ g.mL⁻¹ baixa; 1 – 11 μ g.mL⁻¹ média; 11 – 50 μ g.mL⁻¹ alta e > 50 μ g.mL⁻¹ elevada.

A produção de AIA pelos isolados do horizonte B variou entre 5,83 μ g.mL⁻¹ e 46,30 μ g.mL⁻¹. Os isolados que produziram os maiores níveis de AIA foram 157; 274 e 280. A

produção dos respectivos isolados foi classificada como alta, os quais não diferiram estatisticamente entre si e foram superiores (p < 0,05) aos demais isolados. Dentre os isolados produtores de AIA, o maior produtor foi 157, produzindo 46,30 μ g.mL⁻¹. O isolado 249 teve a menor produção de AIA, classificada como média, produzindo 5,83 μ g.mL⁻¹ (Tabela 7).

ISOLADO	AIA (µg.mL ⁻¹)	ISOLADO	AIA (µg.mL ⁻¹)
157	46,30 a	258	7,65f
163	11,11e	259	7,75f
167	10,36e	261	8,06f
179	11,43e	262	11,05e
193	8,60f	263	6,46f
194	8,63f	264	11,71e
209	32,15b	269	16,17d
242	20,89c	270	18,78c
249	5,83f	274	44,44a
250	20,73c	280	42,31a
252	8,31f	284	7,31f
253	7,68f	307	31,99b
254	6,99f	327	6,24f
256	8,22f	335	10,36e
257	9,22e		
CV %	13		

Tabela 7. Isolados produtores de AIA obtidos do horizonte B de um perfil de Terra Preta da Amazônia do Pará

Letra minúsculas comparam a produção de AIA entre os isolados. De acordo com a produção de AIA: < 1 μ g.mL⁻¹ baixa; 1 – 11 μ g.mL⁻¹ média; 11 – 50 μ g.mL⁻¹ alta e > 50 μ g.mL⁻¹ elevada.

No horizonte C, dos 123 isolados obtidos, 61 produziram uma quantidade de AIA superior a 1,0 μ g.mL⁻¹. Cerca de 70 % (43) dos isolados apresentaram produção de AIA considerada média, enquanto 23 % (14) produziram AIA em concentração alta e 7 % (4) em concentração elevada (Figura 22).

Figura 22. Frequência da produção de AIA na presença de L-triptofano (5Mm) dos isolados obtidos do horizonte C de um perfil de Terra Preta da Amazônia do Pará



De acordo com a produção de AIA: < 1 μ g.mL⁻¹ baixa; 1 – 11 μ g.mL⁻¹ média; 11 – 50 μ g.mL⁻¹ alta e > 50 μ g.mL⁻¹ elevada.

A produção de AIA pelos isolados do horizonte C variou entre 4,35 μ g.mL⁻¹ e 63,03 μ g.mL⁻¹. Os isolados que produziram os maiores níveis de AIA foram 360; 373; 351A e 351B. A produção dos respectivos isolados foi classificada como elevada, os quais diferiram estatisticamente entre si e foram superiores (p<0,05) aos demais isolados. Dentre os isolados produtores de AIA, o maior produtor foi 360, produzindo 63,03 μ g.mL⁻¹, sendo superior (p<0,05) aos isolados 373 que produziu 59,32 μ g.mL⁻¹; 351B que produziu 57,53 μ g.mL⁻¹ e 351A que produziu 51,24 μ g.mL⁻¹. O isolado 421 teve a menor produção de AIA, classificada como média, produzindo 4,35 μ g.mL⁻¹ (Tabela 8).

ISOLADO	(AIA µg.mL ⁻¹)	ISOLADO	(AIA µg.mL ⁻¹)
344	48,28 e	391	6,33
345	5,07 m	395	44,48 f
346	5,42 m	402	36,93 h
349	4,92 m	405	48,66 e
350	4,95 m	416	5,29 m
351 A	51,24 d	417	34,60 i
351 B	57,53 c	419	34,51 i
352	5,14 m	420	4,44 m
353	5,77 m	421	4.35 m
355	5,20 m	422	4,60 m
356	4,95 m	431	33,82 i
357	5,14 m	434	36,52 h
358	6,05 m	435	36,71 h
360	63,03 a	437	5,36 m
361	49,16 e	438	5,70 m
373	59,32 b	439	5,58 m
375	30,64 j	440	4,82 m
376	5,39 m	441	5,29 m
377	5,07 m	443	4,73 m
378	8,441	444	10,83 k
379	5,33 m	445	31,33 j
380	5,23 m	446	5,29 m
381	5,17 m	447	4,82 m
382	40,99 g	448	5,29 m
383	5,67 m	449	7,871
384	8,091	450	6,61 m
385	5,26 m	451	8,781
386	5,89 m	452	6,21 m
387	5,61 m	458	34,73 i
388	8,531		
389	6,52 m		
390	8,47 1		
CV %	4,94		

Tabela 8. Isolados produtores de AIA obtidos do horizonte C de um perfil de Terra Preta da Amazônia do Pará

Letra minúsculas comparam a produção de AIA entre os isolados. De acordo com a produção de AIA: < 1 μ g.mL⁻¹ baixa; 1 - 11 μ g.mL⁻¹ média; 11 - 50 μ g.mL⁻¹ alta e > 50 μ g.mL⁻¹ elevada.

3.3.5.3 Produção de sideróforos

No horizonte A, apenas o isolado 108 foi capaz de produzir sideróforos, o que corresponde a 1 % do total de 149 isolados avaliados. Quanto ao horizonte B, os isolados produtores de sideróforos foram: 193; 194; 198; 238; 255; 264; 295 e 307. Estes correspondem a cerca de 4 % dos 194 isolados avaliados. Já no horizonte C, os isolados 351A; 434; 435 e 454 foram capazes de produzir sideróforos e correspondem a aproximadamente 3 % do total de isolados avaliados no respectivo horizonte.

3.3.5.4 Fixação biológica de nitrogênio em meio semissólido

Dos 45 isolados selecionados no horizonte A, cerca de 84 % (38) foram capazes de formar película indicando a possibilidade de fixar nitrogênio. E apenas 16 % (7) não formaram película. Além disso, foi avaliada a capacidade dos isolados modificarem o pH do meio, de modo que 18 % (8) dos isolados acidificou o meio, outros 18 % alcalinizaram o meio e a maior parte dos isolados, correspondente, a 49 % (22) manteve o pH perto da neutralidade (Figura 23).

Figura 23. Frequência de isolados que apresentaram capacidade de fixar nitrogênio no horizonte A de um perfil de Terra Preta da Amazônia do Pará



Positivo, formaram película; Negativo, não formaram película. pH ácido, meio amarelo; pH alcalino, meio azul; pH neutro, meio verde.

No horizonte B, foram testados 53 isolados. Dentre os quais aproximadamente 91 % (48) dos isolados formaram película, indicando a possibilidade de fixar nitrogênio, enquanto 9 % (5) não formaram película. Quanto ao pH do meio, 55 % (29) dos isolados apresentaram pH neutro, 23 % (12) pH alcalino e 13 % (7) pH ácido (Figura 24).

Figura 24. Frequência de isolados que apresentaram capacidade de fixar nitrogênio no horizonte B de um perfil de Terra Preta da Amazônia do Pará



Positivo, formaram película; Negativo, não formaram película. pH ácido, meio amarelo; pH alcalino, meio azul; pH neutro, meio verde.

No horizonte C, foram testados 68 isolados. Cerca de 84 % (57) dos isolados foram capazes de formar película, indicando a possibilidade de fixar nitrogênio. E somente 16 % (11) não formaram película. Quanto ao pH do meio, aproximadamente, 46 % (26) dos isolados mantiveram o pH do meio, 46 % (26) alcalinizaram o meio e 9 % (5) acidificaram o meio (Figura 25).

Figura 25. Frequência de isolados que apresentaram capacidade de fixar nitrogênio no horizonte C de um perfil de Terra Preta da Amazônia do Pará



Positivo, formaram película; Negativo, não formaram película. pH ácido, meio amarelo; pH alcalino, meio azul; pH neutro, meio verde.

3.3.6 Presença dos genes nifH e acdS nos isolados de Terra Preta da Amazônia

Foram selecionados 52 isolados para a extração de DNA, testes moleculares e sequenciamento do gene 16S rRNA. Destes, 12 isolados pertenciam ao horizonte A, 19 isolados pertenciam ao horizonte B e 21 isolados pertenciam ao horizonte C. Quanto aos critérios utilizados para a seleção dos isolados foi descrito no tópico 3.2.6.4 do material e métodos.

Dos 12 isolados selecionados no horizonte A, o 14; 55; 61 e 141 (4) foram positivos para a presença do gene *nif*H e os isolados 95; 104 e 108 (3) foram positivos para a presença do gene *acd*S. No horizonte B, do total de 19 isolados selecionados, o 157; 163; 193; 238; 250; 270 e 274 (7) foram positivos para a presença do gene *nif*H e os isolados 193 e 194 (2) foram positivos para o gene *acd*S. Quanto ao horizonte C, foram selecionados 21 isolados, dos quais 12 (351A; 351B; 382; 395; 402; 405; 419; 431; 434; 435; 445 e 459) foram positivos para a presença do gene ni*f*H e nenhum deles foi positivo para a presença do gene *acd*S. Dos 52 isolados selecionados ao longo do perfil, o isolado 193 destacou-se devido a presença positiva tanto do gene ni*f*H quanto do gene *acd*S (Tabela 9).

Isolados	Solubilizaçã	AIA	Sideróforo	Gene	Gene	Película
	0			(<i>nif</i> H)	(acdS)	(FBN)
	Ca ₃ (PO ₄) ₂			-		
17	-	Alta	-	+	-	+
55	Baixo	Alta	-	+	-	-
61	Baixo	Alta	-	+	-	+
88	Médio	Alta	-	-	-	+
95	Baixo	Alta	-	-	+	-
96	Baixo	Alta	-	-	-	-
104	Médio	-	-	-	+	+
107	Médio	-	-	-	-	+
108	Baixo	_	+	_	+	+
126	-	Média	_	_	-	+
120	_	Alta	_	_	_	+
140	_	Alta	_	+	_	+
157		Alta		-		1
163	-	Alta	-	- -	-	т
105	-	Alta	-	+	-	+
1/9	-	Alla	-	-	-	+
195	-	Media	+	+	+	+
194	-	Media	+	-	+	-
198	-	-	+	-	-	-
209	- D :	Alta	-	-	-	+
238	Baixo	-	+	+	-	+
242	Baixo	Alta	-	-	-	+
250	Baixo	Alta	-	+	-	-
255	-	-	+	-	-	+
262	-	Alta	-	-	-	+
264	-	Alta	+	-	-	+
269	Médio	Alta	-	-	-	+
270	Baixo	Alta	-	+	-	+
274	-	Alta	-	+	-	+
280	-	Alta	-	-	-	+
295	Baixo	-	+	-	-	+
307	-	Alta	+	-	-	+
344	-	Alta	-	-	-	+
351 A	Baixo	Elevada	+	+	-	+
351 B	Baixo	Elevada	-	+	-	+
360	Baixo	Elevada	-	-	-	+
361	-	Alta	-	-	-	-
373	Baixo	Elevada	-	-	-	+
375	-	Alta	-	-	-	+
382	Médio	Alta	-	+	-	+
395	Médio	Alta	-	+	-	+
402	Médio	Alta	-	+	-	+
405	Médio	Alta	-	+	-	-
417	-	Alta	-	-	-	-
419	_	Alta	_	+	_	+
431	Baixo	Alta	_	+	-	+
434	Baixo	Alta	+	+	_	+
435	Média		1 	+	_	۰ ــــــــــــــــــــــــــــــــــــ
415	Raivo		F	1- -	-	F
443 151	DalXU	Alla	-	Ŧ	-	-
434 159	-	- A 1to	+	-	-	+
430 450	- Mádia	Alla	-	-	-	+
439	Niedio	-	-	+	-	+
463	Medio	-	-	-	-	+

Tabela 9. Mecanismos de promoção de crescimento de plantas dos isolados prospectados no perfil de Terra Preta da Amazônia

 $Ca_3(PO_4)_2$ – fosfato de cálcio; AIA - Ácido indolacético; *nif*H – gene que codifica para fixação biológica de nitrogênio; *acd*S – gene que codifica para ACC deaminase; FBN – Fixação biológica de nitrogênio; (+) presença; (-) ausência; IS < 2 baixo; IS 2 – 4 médio; 1 – 11 µg.mL⁻¹ média; 11 – 50 µg.mL⁻¹ alta e > 50 µg.mL⁻¹ elevada.

3.3.7 Sequenciamento do gene 16S rRNA dos isolados bacterianos de Terra Preta da Amazônia

Um total de 46 isolados obtidos dos horizontes A, B e C foram sequenciados, mas alguns isolados apresentaram sequências de baixa qualidade. As sequências obtidas variaram de 1,2 a 1,4 pb e apresentaram 76,6 a 96,7 % de similaridade com as sequências depositadas no EzBioCloud (Tabela 10). As relações filogenéticas entre as sequências são apresentadas na Figura 26 e a maioria das cepas sequenciadas são *Bacillus* (39,1 %) e *Pseudomonas* (26,1 %).

		Características	Nº de	Tipo de Cepa	Similaridade
Isolado	Origem	culturais	nucleotídeos	(Espécies)	%
17	HA	R; C; O; CR; M; EL	1,3	Brevibacillus fortis	92,4
55	HA	R; IR; T; CR; P; EL	1,4	Brevibacillus gelatini	90,5
61	HA	R; IR; O; CR; M; EL	1,4	Paenibacillus purispatii	89,7
95	HA	R; IR; O; BR; E; EM	1,4	Aneurinibacillus aneurinilyticus	92,7
104	HA	R; IR; O; BR; E; EM	1,3	Bacillus velezensis	96,7
108	HA	R; IR; O; BR; E; EM	1,3	Bacillus safensis subsp. safensis	95,8
126	HA	R; C; O; CR; P; EL	1,2	Paenibacillus contaminans	97,9
141	HA	R; C; O; CR; P; EL	1,3	Paenibacillus contaminans	95,5
157	HB	R; C; O; AM; P; EL	1,3	Pseudomonas pisciculturae	96,0
163	HB	R; IR; O; CR; M; EL	1,3	ATMT_s	92,4
179	HB	R; C; T; CR; P; EL	1,4	Neobacillus soli	82,0
193	HB	R; C; O; AM; E; EL	1,3	Bacillus velezensis	92,7
194	HB	R; C; O; AM; E; EL	1,3	ATMT_s	92,2
209	HB	R; C; O; CR; P; EL	1,3	ATMT_s	94,5
238	HB	R; IR; O; BR; E; EL	1,2	Paenibacillus tyrfis	97,1
242	HB	R; C; O; CR; P; EL	1,3	Bacillus siamensis	94,2
250	HB	I; IR; O; BR; M; EL	1,3	EU571156_s	92,2
255	HB	R; IR; O; BR; M; EA	1,3	Bacillus velezensis	93,0
262	HB	R; IR; O; BR; P; EM	1,4	Bacillus velezensis	93,8
264	HB	R; IR; T; CR; E; EL	1,3	Bacillus velezensis	92,0
269	HB	R; C; O; AM; E; EL	1,3	Bacillus velezensis	96,0
270	HB	R; IR; T; CR; M; EL	1,3	EU571156_s	92,4
274	HB	R; C; O; LA; E; EM	1,2	Bacillus siamensis	97,0
280	HB	R; IR; O; BR; E; EL	1,3	Aneurinibacillus aneurinilyticus	94,9
295	HB	R; IR; O; BR; E; EL	1,3	Aneurinibacillus aneurinilyticus	92,9
307	HB	R; IR; O; BR; E; EL	1,3	Aneurinibacillus aneurinilyticus	93,4
344	HC	R; C; O; CR; P. EL	1,3	Bacillus siamensis	93,7
351A	HC	R; C; O; CR; E; EL	1,4	Pseudomonas pisciculturae	76,6
351B	HC	R; C; O; CR; E; EL	1,3	Bacillus velezensis	76,7
360	HC	R; C; O; BR; E EL	1,3	Bacillus velezensis	96,4
361	HC	R; C; O; AM; E; EL	1,2	Bacillus velezensis	95,5
373	HC	R; C; O; BR; E; EL	1,3	Bacillus velezensis	93,2
375	HC	R; C; O; BR; E; EL	1,3	Bacillus siamensis	90,9
382	HC	R; C; O; AM; E; EL	1,3	Pseudomonas pisciculturae	94,5
395	HC	R; C; O; AM; E; EL	1,3	Pseudomonas kitaguniensis	92,1
402	HC	R; C; O; BR; E; EL	1,3	Pseudomonas pisciculturae	93,4
405	HC	R; C; O; AM; E; EL	1,3	Pseudomonas kitaguniensis	94,7
417	HC	R; C; O; BR; E; EL	1,3	Bacillus velezensis	93,0
419	HC	R; C; O; BR; E; EL	1,2	Pseudomonas kitaguniensis	96,4
431	HC	R; C; O; AM; E; EL	1,3	Pseudomonas kitaguniensis	96,1
434	HC	R; C; O; BR; E; EM	1,3	Pseudomonas kitaguniensis	94,5

 Tabela 10. Identificação de isolados obtidos de um perfil de Terra Preta da Amazônia, no sítio

 Jabuti, Pará, Brasil, com base nas sequências do EzBioCloud

Continua...

					Conclusao
435	HC	R; C; O; CR; E; EL	1,3	Pseudomonas kitaguniensis	94,2
445	HC	R; C; O; CR; E; EL	1,3	Pseudomonas cyclaminis	96,7
458	HC	R; C; O; CR; E; EM	1,3	Bacillus siamensis	93,4
459	HC	R; C; O; RO; E; EA	1,3	Pseudomonas kitaguniensis	84,0
463	HC	R; C; O; AM; E; EM	1,3	Bacillus velezensis	94,1

Tabela 10. Identificação de isolados obtidos de um perfil de Terra Preta da Amazônia, no sítio Jabuti, Pará, Brasil, com base nas sequências do EzBioCloud

 Conclusão

R: crescimento rápido; I: crescimento intermediário; C: colônia circular; IR: colônia irregular; O: colônia opaca; T: colônia translúcida; CR: colônia creme; BR: colônia branca; LA: colônia laranja; AM: colônia amarela; RO: colônia rosa; E: produção de muco escassa; P: pouca produção de muco; M: muita produção de muco; EL: elevação leve; EM: elevação média; EA: elevação alta; HA: horizonte A; HB: horizonte B; HC: horizonte C. **Figura 26.** Árvore filogenética Neighbor-joining de sequências 16S rRNA de isolados obtidos de um perfil de Terra Preta da Amazônia, no sítio Jabuti, Pará, Brasil



As distâncias evolutivas foram calculadas utilizando o método Kimura de 2 parâmetros. Os valores de bootstrap (1.000 réplicas) são mostrados ao lado das ramificações

3.4 DISCUSSÃO

3.4.1 Atributos físicos e químicos do solo

Nos horizontes antrópicos, a presença de fragmentos de diferentes tamanhos de carvão, resíduos orgânicos e carbonizados são associados ao processo de antrosolização (atividade humana), através do uso contínuo do solo para garantir a sobrevivência (CUNHA et al., 2009). A quantidade de micropartículas de carvão é determinante para o processo de pigmentação do solo através da melanização, que ocorre principalmente nos horizontes superficiais sob influência antrópica. A incorporação e homogeneização de fragmentos através de atividade humana ou biológica, respectivamente, tem ação fundamental na formação dos horizontes A, AB e Bt. A presença de carvão vegetal tem sido associada também ao aumento na estabilidade e acúmulo de matéria orgânica através do processo de cumulização na TPA (MACEDO et al., 2017).

O predomínio da fração areia nos horizontes antrópicos pode ser associado à utilização de fogo pelas comunidades que habitaram a região anteriormente. Além disso, o processo de iluviação pode justificar o transporte de argila ao longo do perfil, com deposição nos horizontes mais profundos. Em solos arenosos, a matéria orgânica aumenta o volume de poros auxiliando na retenção no solo e disponibilidade de água e nutrientes para as plantas. Sendo assim, a presença de matéria orgânica e carvão vegetal nos horizontes sob influência antrópica é um fator determinante para a fertilidade dos solos de TPA (SOUZA et al., 2016).

O pH dos perfis de TPA geralmente são mais baixos (ácidos), variando entre 5,6 e 4,10, devido a oxidação biológica de compostos orgânicos (AQUINO et al., 2016). Um exemplo ocorre quando o CO₂ liberado reage com a água formando ácido carbônico (H₂CO₃) e sua dissociação libera H⁺, responsável por acidificar o meio (QUEIROZ et al., 2009). A deposição de materiais orgânicos como restos de comida e ossos de animais, ricos em apatita biogênica, nos solos antropogênicos favorece o aumento dos teores de fósforo, principalmente, na forma de fosfatos de cálcio (Ca-P). Outro fator importante na disponibilidade de fósforo e atividade antrópica nos solos em questão é a presença de fragmentos de cerâmica (PARNELL; TERRY; NELSON, 2002).

Após sofrer ação do intemperismo, a cerâmica libera nutrientes que estão em sua matéria como, por exemplo, o fósforo. Macedo et al. (2019) observaram maiores teores de fósforo de modo geral em perfis de TPA, principalmente, em profundidade, fato atribuído a mobilidade, do elemento, resultante da precipitação da matéria orgânica e redução da adsorção de P. Além disso, os ácidos orgânicos adsorvidos bloqueiam os sítios de adsorção e solubilizando os óxidos

de alumínio e ferro que estavam retidos, reduzindo a superfície de adsorção, o que favorece a disponibilidade de P. Em solos da Amazônia, não antropogênicos, as concentrações de P geralmente são abaixo de 5 mg.dm⁻³ (AQUINO et al., 2016).

O cobre é um elemento de fácil mobilidade no perfil, o que justifica sua presença nos horizontes mais profundos. Wilson, Davidson e Cresser (2008) relataram a presença de Cu proveniente de alimentos e fragmentos ósseos nos horizontes antrópicos. Além disso, a presença de ossos e carvão vegetal em solos de TPA pode favorecer a retenção do Cu assim, como o Zn, P e Ca. De acordo com Glaser (2007), o baixo teor de magnésio em horizontes antrópicos pode ser associado à relação Ca/Mg e a presença de carvão vegetal no solo. A porosidade do carvão serve como abrigo para micro-organismos que podem auxiliar na retenção e solubilização de nutrientes através da liberação de ácidos orgânicos, como, por exemplo, potássio e fósforo, evitando, assim, as perdas por lixiviação (LEHMANN et al., 2003).

Os elevados teores de matéria orgânica em solos de TPA foram relacionados às atividades antrópicas ao longo do processo de formação do solo. Essa MO se concentra nos horizontes superficiais de solos sob influência antrópica e segue diminuindo ao longo do perfil (CUNHA et al., 2007). A presença de zinco e manganês em solos de TPA tem sido relacionada à atividade antrópica. Os elevados teores de Mn nos horizontes antrópicos podem ser explicados pela presença de maiores teores de MO nos horizontes superficiais, já que esse elemento pode ser facilmente complexado. Enquanto a presença de Mn é relacionado a adição de restos vegetais (folhas, casca, madeiras e outros componentes ricos em Mn) ao solo, o teor de Zn é modulado pela presença de restos animais ricos no elemento em questão, como ossos e pele de animais (SÁTIRO et al., 2021). O boro nos solos antropogênicos, assim como o Zn, tem origem em resíduos vegetais. Entretanto, por apresentar baixa capacidade de retenção e alta mobilidade é perdido facilmente ao longo do perfil, não apresentando grandes variações em seus teores. Outro fator determinante para a permanência do B no solo é o pH, uma vez que o elemento é adsorvido por óxidos de ferro e de alumínio em pH acima de 7,0 (GOLDBERG; FORSTER; HEICK, 1993).

A matéria orgânica humificada presente nos horizontes superficiais favorece a dissociação dos óxidos de ferro dando origem a complexos solúveis que podem ser perdidos por lixiviação, uma vez tendo sua cristalinidade reduzida, os óxidos se movimentam com mais facilidade para baixo. Embora o teor de matéria orgânica possa ser semelhante entre os horizontes dentro de um mesmo perfil, os solos de TPA podem apresentar em sua composição uma matéria orgânica mais recalcitrante proporcionando um ambiente propício para a complexação de cátions metálicos. Desta forma, os teores de Fe, por exemplo, em horizontes

não antrópicos (mais profundos) é significativamente maior do que nos horizontes sob influência antrópica (CAMPOS et al., 2011). Em solos de TPA, alguns atributos como, por exemplo, a acidez potencial, podem variar ao longo do perfil e, por isso, não podem ser associados a atividade antrópica (MACEDO et al., 2019).

3.4.2 Glomalina e prospecção de bactérias promotoras de crescimento de plantas

A pirólise de excrementos, ossos e biomassa vegetal realizada pelos índios e povos antepassados deram origem ao biocarvão e a incorporação dessa matéria prima pirolisada altera as propriedades químicas, físicas e biológicas do solo. Os fragmentos de biocarvão podem apresentar diferentes tamanhos de partículas, influenciando na textura e porosidade do solo (GLASER, 2007). A estrutura porosa deste material serve de abrigo tanto para nutrientes quanto para bactérias e fungos, protegendo-os contra o ataque de predadores, favorecendo, assim, a atividade microbiana no solo. A composição dos resíduos utilizados na queima é determinante para as comunidades microbianas nos solos antropogênicos. Desta forma, a gênese e elevada fertilidade dos solos de TPA têm sido associadas a presença de micro-organismos de interesse biotecnológico (ATKINSON; FITZGERALD; HIPPS, 2010).

Os maiores teores de glomalina total e facilmente extraível encontrados no horizonte antrópico reforçam a presença de FMA na zona sob influência das raízes, assim como, a importância da interação desses fungos com as raízes das plantas. O fato das frações da glomalina apresentarem maior estabilidade nos horizontes superficiais pode ser associado à zona de maior atividade biológica e presença de raízes de plantas, na rizosfera. Maia, Vasconcelos e Carvalho (2015) associaram a remoção de serrapilheira da camada superficial do solo a redução na colonização micorrízica e esse processo ocasionou redução no teor de glomalina. Esse fato reafirma a importância da matéria orgânica presente em maiores quantidades na TPA. Além disso, a presença de raízes e MOS diminui ao longo do perfil, o que justifica a redução dos teores de glomalina nos horizontes mais profundos (SEGUEL et al., 2008).

O maior aporte de matéria orgânica, presença de raízes de plantas e biocarvão nos horizontes superficiais apoia a hipótese em que as unidades formadoras de colônias (UFC) são mais elevadas nos horizontes sob influência antrópica (PAGANO et al., 2016) apresentando declínio em profundidade. A partir de 80 cm, profundidade correspondente ao horizonte C do presente estudo, O'Neill et al. (2009) observaram uma diminuição da população de bactérias em solos sob influência antrópica. As cepas identificadas no presente estudo pertencem aos filos Proteobacteria e Firmicute, dominante e mais diversos no solo (PEDRINHO et al., 2020).

Dentro desses filos existem uma ampla diversidade de bactérias promotoras de crescimento de plantas (RANA et al., 2020).

Os micro-organismos do solo contribuem para o bom desenvolvimento das plantas através de diferentes mecanismos de promoção de crescimento vegetal disponibilizando nutrientes, conferindo resistência contra o ataque de patógenos e promovendo crescimento através da liberação de diferentes substâncias (AMBROSINI et al., 2012). Algumas bactérias quando testadas em meio semi-sólido livre de N tendem a formar película indicando a possível capacidade de fixar nitrogênio. Entretanto, Tripathi et al. (2002) ressaltaram a importância de realizar o ensaio de redução de acetileno (ARA) para confirmar se de fato os isolados que formam película no meio livre de N apresentam a enzima nitrogenase ativa. Isso porque a maioria das bactérias que apresentam película nem sempre são diazotróficas, assim como foi observado nos isolados obtidos da TPA. Algumas bactérias diazotróficas pertencentes ao gênero Bacillus apresentam a capacidade de realizar também outros mecanismos de promoção de crescimento de plantas. Dentre os quais destacam-se produção de ACC deaminase e AIA (MAHESHWARI; BHUTANI; SUNEJA, 2020). Blaha et al. (2006) destacaram a importância de utilizar abordagens moleculares para acessar o gene acdS que codifica para a produção de ACC deaminase, uma vez que através de testes fenotípicos nem sempre é possível identificar todos as bactérias capazes de realizar o respectivo mecanismo.

A produção de sideróforos tem relação direta com o pH do solo, já que o ferro é um nutriente que tem sua disponibilidade evidenciada em pH ácido, como foram encontrados nos solos do presente estudo, assim, valores elevados de ferro no solo podem inibir a produção de sideróforos. Por outro lado, valores de pH abaixo da faixa de disponibilidade do Fe, podem tornar o nutriente insolúvel dificultando a absorção das plantas e com isso as bactérias promotoras de crescimento tendem a produzir sideróforos-Fe a fim de suprir a necessidade das plantas (TAMARIZ-ANGELES et al., 2021). Além disso, a presença de outros metais no solo pode também determinar o tipo de sideróforo produzido pelos micro-organismos formando complexos, por exemplo, com o alumínio que quando em altas concentrações no solo torna-se um problema de toxidez para as plantas, inibindo principalmente o desenvolvimento radicular (SHETTY et al., 2021). Sendo assim, a utilização desse alumínio para a produção de sideróforo-Al é uma estratégia benéfica desenvolvida pelos micro-organismos para beneficiar as plantas.

Em geral, as bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* foram as mais expressivas no solo de TPA, exibindo um ou mais mecanismos. Embora as *Pseudomonas* tenham sido anteriormente associadas à ação patogênica, apresentam a capacidade de colonizar de forma agressiva as raízes das plantas utilizando como substrato diferentes fontes de carbono (AMBROSINI et al., 2012). Georgieva et al. (2018) e Li et al. (2017) comprovaram a influência positiva que esse gênero de bactérias exerce no solo, melhorando o crescimento das plantas, através da capacidade de fixação biológica de nitrogênio, produção de AIA, ACC deaminase e solubilização de P. Em condições de estresse abiótico as *Pseudomonas* sp. são altamente resistentes e a inoculação de sementes com BPCP pertencentes a esse gênero para aliviar o estresse salino tem melhorando a taxa de germinação das sementes, desenvolvimento das raízes e parte aérea das plantas através da produção de auxinas, giberelinas e citocininas (EGAMBERDIEVA, 2009). Esse fato pode estar relacionado a supressão da produção de fitohormônios que são produzidos naturalmente durante o desenvolvimento das plantas, mas devido às condições de estresse são inibidos ou produzidos em quantidades não suficientes para o desenvolvimento da planta.

De acordo com Mirza et al. (2001), as condições de cultivo dos isolados, o tempo de crescimento e a composição do substrato são fatores determinantes para produção de AIA por diferentes gêneros de bactérias promotoras de crescimento de plantas. Sendo assim, essa produção pode variar entre as mais diversas espécies e cepas encontradas no solo, conforme foi possível observar nos isolados da TPA testados quanto a produção de AIA, solubilização de fosfato de cálcio, produção de sideróforos, fixação biológica de nitrogênio e ACC deaminase. Além disso, a elevada produção de compostos indólicos pode estar associada tanto ao melhor desenvolvimento das plantas quanto à melhor solubilização de fosfato. Dentre os diferentes grupos de bactérias produtoras de AIA, Duca et al. (2014) atribuíram as variações na produção de AIA às vias de biossíntese desse fitohormônio utilizadas por cada organismo sendo sua produção modulada por fatores ambientais e genéticos.

Algumas das bactérias identificadas no presente estudo são encontradas na rizosfera e estão entre os gêneros mais diversos no solo, onde se destacam pela capacidade de tolerar condições de estresse, sendo boas fixadoras de N₂, produtoras de sideróforos e solubilizadoras de P, como, por exemplo, *Pseudomonas, Bacillus, Paenibacillus* e *Brevibacillus* (KARAGÖZ et al., 2012). Çakmakçi et al. (2010) observaram a influência de um clima ameno, elevada precipitação e pH nos gêneros de bactérias presentes no solo. Avaliando solos de pH entre 3,8 e 6,1, condições que se assemelham ao local de coleta dos solos de TPA, foi possível observar uma menor riqueza e diversidade de bactérias em solos ácidos. O pH é um fator determinante para as comunidades microbianas no solo e obtenção de bactérias solubilizadores de fósforo, onde as cepas isoladas a partir de pH ácido apresentam maior amplitude de resistência, enquanto as de pH mais alto são mais sensíveis. De modo geral, a liberação de ácidos orgânicos por

bactérias solubilizadoras de fosfato é responsável por acidificar o meio, disponibilizando fósforo e revelando uma relação inversa entre P solúvel e pH do solo (CHEN et al., 2006)

Ahmad et al. (2018) destacaram a presença do gênero *Bacillus* nos mais diversos ambientes, bem como a importância dessas cepas na solubilização de fosfato através da liberação de ácidos orgânicos consorciados com outros mecanismos de promoção de crescimento vegetal. Susilowanti et al. (2015) comprovaram a eficiência de diferentes gêneros de *Bacillus* na FBN, produção de AIA, degradação da celulose e solubilização de fosfato. Através desses achados que corroboram os do presente estudo, os autores reforçaram o fato dessas bactérias apresentarem boa interação na rizosfera utilizando de forma eficiente os nutrientes fornecidos pelas plantas, metabolizando os exsudados radiculares e realizando antagonismos, a fim de inibir o crescimento de outros micro-organismos.

Contudo, é de extrema importância trabalhos que comprovam a eficiência da inoculação de bactérias com potencial biotecnológico e a utilização do consórcio microbiano a fim de assegurar a produtividade das culturas, principalmente, com isolados obtidos de solos tão promissores como, por exemplo, a TPA e os solos de regiões áridas (ARAÚJO et al., 2020; BARBACCIA et al., 2022). Desta forma, esses estudos têm aberto caminhos para a descoberta de fertilizantes e defensivos à base de micro-organismos (OLIVEIRA-PAIVA et al., 2020). Além disso, em resposta a inoculação microbiana as plantas apresentam maior resistência sistêmica ao ataque de patógenos e aos estresses biótico e abiótico (ARAÚJO et al., 2023).

3.5 CONCLUSÕES

- ✓ As bactérias isoladas do perfil de Terra Preta da Amazônia apresentam elevado potencial biotecnológico e ampla diversidade morfológica, sendo capazes de realizar diferentes mecanismos de promoção de crescimento em plantas.
- ✓ De modo geral, as bactérias apresentaram resultados positivos para mais de um mecanismo de promoção de crescimento e foi possível observar uma maior quantidade de BPCP nos horizontes superficiais.
- ✓ As bactérias 193 (Bacillus velezensis), 351 A (Pseudomonas pisciculturae), 434 (Pseudomonas kitaguniensis) e 435 (Pseudomonas kitaguniensis) são as de maior potencial biotecnológico de acordo com os ensaios in vitro, respondendo de forma positiva para pelo menos quatro dos cinco mecanismos (solubilização de fosfato, produção de AIA, produção de sideróforos, presença do gene nifH e gene acdS) testados.

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, M.; AHMAD, I.; HILGER, T. H.; NADEEM, S. M.; AKHTAR, M. F.; JAMIL, M.; HUSSAIN, A.; ZAHIR, Z. A. Preliminary study on phosphate solubilizing *Bacillus subtilis* strain Q3 and Paenibacillus sp. strain Q6 for improving cotton growth under alkaline conditions. **PeerJ**, v. 6, p. e5122, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.7717/peerj.5122>.

ALBDAIWI, R. N.; KHYAMI-HORANI, H.; AYAD, J. Y.; ALANANBEH, K. M.; AL-SAYAYDEH, R. Isolation and characterization of halotolerant plant growth promoting rhizobacteria from durum wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) cultivated in saline areas of the dead sea region. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1639, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01639>.

AMBROSINI, A.; BENEDUZI, A.; STEFANSKI, T.; PINHEIRO, F. G.; VARGAS, L. K.; PASSAGLIA, L. M. P. Screening of plant growth promoting rhizobacteria isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Plant and Soil**, v. 356, p. 245-264, 2012. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s11104-011-1079-1>.

AQUINO, J. P. A.; ANTUNES, J. E. L.; BONIFÁCIO, A.; ROCHA, S. M. B.; AMORIM, M. R.; ALCÂNTARA NETO, F.; ARAUJO, A. S. F. Plant growth-promoting bacteria improve growth and nitrogen metabolism in maize and sorghum. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 33, p. 249-260, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s40626-021-00209-x>.

AQUINO, R. E.; MARQUES JUNIOR, J.; CAMPOS, M. C. C.; OLIVEIRA, I. A.; BAHIA, A. S. R. S.; SANTOS, L. A. C. Characteristics of color and iron oxides of clay fraction in Archeological Dark Earth in Apuí region, southern Amazonas. **Geoderma**, p. 35-44, 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2015.07.010>.

ARAÚJO, V. L. V. P.; FRACETTO, G. G. M.; SILVA, A. M. M.; PEREIRA, A. P. A.; FREITAS, C. C. G.; BARROS, F. M. R.; SANTANA, M. C.; FEILER, H. P.; MATTEOLI, F. P.; FRACETTO, F. J. C.; CARDOSO, E. J. B. N. Potential of Growth-Promoting Bacteria in Maize (*Zea mays* L.) varies according to Soil Moisture. **Microbiological Research**, p. 127352, 2023. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127352>.

ARAÚJO, V. L. V. P.; LIRA, J. M. A.; SOUZA, J. V. S.; COELHO, A. F. J.; FRACETTO, F.J.C.; DINI, F. A.; ARAUJO P. A. P.; MENDES JÚNIOR, J.P.; MARTINS DO RÊGO, B. F.; FRACETTO, G.G.M. Bacteria from tropical semiarid temporary ponds promote maize growth under hydric stress. **Microbiological Research**, v. 240, n. 126564, p. 1-10, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126564>.

ATKINSON, C. J.; FITZGERALD, J. D.; HIPPS, N. A. Potential mechanisms for achieving agricultural benefits from biochar application to temperate soils: a review. **Plant and soil**, v. 337, p. 1-18, 2010. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s11104-010-0464-5>.

BARBACCIA, P.; GAGLIO, R.; DAZZI, C.; MICELI, C.; BELLA, P.; PAPA, G.; SETTANNNI, L. Plant Growth-Promoting Activities of Bacteria Isolated from an Anthropogenic Soil Located in Agrigento Province. **Microorganisms**, v. 10, n. 11, p. 2167, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.3390/microorganisms10112167>. BARBOSA, J. Z. MOTTA, A. C, V.; CORRÊA, R. S.; MELO, V. F.; MUNIZ, A. W.; MARTINS, G. C.; SILVA, L. C. R.; TEIXEIRA, W. G.; YOUNG, S. D. BROADLEY, M. R. Elemental signatures of an Amazonian Dark Earth as result of its formation process. **Geoderma**, v. 361, p. 114085, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2019.114085>.

BENTO, L. R.; CONSTATINO, I. C.; TADINI, A. M.; MELO, C. A.; FERREIRA, O. P.; MOREIRA, A. B.; BISINOTI, M. C. Chemical and spectroscopic characteristics of anthrosol (amazonian dark earth) and surrounding soil from the Brazilian amazon forest: evaluation of mineral and organic matter content by depth. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, p. 1623-1634, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.21577/0103-5053.20200048>.

BERRAQUERO, F. R.; CORMENZANA, A. R.; BERRAQUERO, F. R.; CORMENZANA, A. R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo, 1 de janeiro de 1976.

BLAHA, D.; PRIGENT-COMBARET, C.; MIRZA, M. S.; MOËNNE-LOCCOZ, Y. Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene acdS in phytobeneficial and pathogenic Proteobacteria and relation with strain biogeography. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 56, n. 3, p. 455-470, 2006. Disponível em: ">https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00082.x>.

CAMPOS, M. C. C.; RIBEIRO, M. R.; SOUZA JÚNIOR, V. S.; RIBEIRO FILHO, M. R.; SOUZA, R. V. C. C.; ALMEIDA, M. C. Caracterização e classificação de terras pretas arqueológicas na Região do Médio Rio Madeira. **Bragantia**, v. 70, p. 598-609, 2011.

ÇAKMAKÇI, R.; DÖNMEZ, M. F.; ERTÜRK, Y.; ERAT, M.; HAZNEDAR, A.; SEKBAN, R. Diversity and metabolic potential of culturable bacteria from the rhizosphere of Turkish tea grown in acidic soils. **Plant and Soil**, v. 332, p. 299-318, 2010. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s11104-010-0295-4>.

CHEN, Y. P; REKHA, P. D.; ARUN, A. B.; SHEN, F. T.; LAI, W. A.; YOUNG, C. C. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. **Applied soil ecology**, v. 34, n. 1, p. 33-41, 2006. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2005.12.002>.

CUNHA, T. J. F.; MADARI, B. E.; BENITES, V. M.; CANELLAS, L. P.; NOVOTNY, E. H.; MOUTT, R. O.; TROMPOWSKY, P. M.; SANTOS, G. A. Fracionamento químico da matéria orgânica e características de ácidos húmicos de solos com horizonte A antrópico da Amazônia (Terra Preta). Acta Amazonica, v. 37, p. 91-98, 2007. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S0044-59672007000100010>.

CUNHA, T. J. F.; MADARI, B. E.; CANELLAS, L. P.; RIBEIRO, L. P.; BENITES, V. M.; SANTOS, G. A. Soil organic matter and fertility of anthropogenic dark earths (Terra Preta de Índio) in the Brazilian Amazon basin. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 85-93, 2009. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S0100-06832009000100009>.

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

DUCA, D. Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 106, p. 85-125, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s10482-013-0095-y>.

EGAMBERDIEVA, D. Alleviation of salt stress by plant growth regulators and IAA producing bacteria in wheat. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, n. 4, p. 861-864, 2009. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s11738-009-0297-0>.

EMBRAPA. **Manual de métodos de análise de solos**. 3. ed. Brasília, DF, 2017. 575p.

FERREIRA, C. M. H.; SOARES, H. M. V. M.; SOARES, E. V. Promising bacterial genera for agricultural practices: An insight on plant growth-promoting properties and microbial safety aspects. **Science of the total environment**, v. 682, p. 779-799, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.225>.

GARCIA, M. V. C.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Combining microorganisms in inoculants is agronomically important but industrially challenging: case study of a composite inoculant containing *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* for the soybean crop. **AMB Express**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1186/s13568-021-01230-8>.

GEORGIEVA, T.; EVTATIEVA, Y.; SAVOV, V.; BRATKOVA, S.; NIKOLOVA, D. Assessment of plant growth promoting activities of five rhizospheric Pseudomonas strains. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 16, p. 285-292, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.08.015>.

GHOSH, S. K.; BERA, T.; CHAKRABARTY, A. M. Microbial siderophore–A boon to agricultural sciences. **Biological Control**, v. 144, p. 104214, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104214>.

GLASER, B. Prehistorically modified soils of central Amazonia: a model for sustainable agriculture in the twenty-first century. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 362, n. 1478, p. 187-196, 2007. Disponível em: https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1978>.

GOLDBERG, S.; FORSTER, H. S.; HEICK, E. L. Boron adsorption mechanisms on oxides, clay minerals, and soils inferred from ionic strength effects. **Soil Science Society of America Journal**, v. 57, n. 3, p. 704-708, 1993. Disponível em: https://doi.org/10.2136/sssaj1993.03615995005700030013x.

GORDON, S. A., WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant physiology**, v. 26, n. 1, p. 192, 1951. Disponível em: <doi.org/10.1104/pp.26.1.192>.

HAMMER, D. A. T.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. **Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data AnalysisPalaeontologia Electronica**. v. 4, issue 1, p. 132-150, 2001. Disponível em: http://palaeoelectronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm. HARA, F. A. DOS S.; OLIVEIRA, L. A. DE. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 3, p. 343–357, set. 2004. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S0044-59672004000300002>.

HUNGRIA, M. & ARAÚJO, R.S. Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Brasília: EMBRAPA. 1994.

HUSSAIN, A.; AHMAD, M.; NAFEES, M.; IQBAL, Z.; LUQMAN, M.; JAMIL, M.; MAQSOOD, A.; MORA-POBLETE, F.; AHMAR, S.; CHEN, J.; ALYEMENI, M. N.; AHMAD, P. Plant-growth-promoting *Bacillus* and *Paenibacillus* species improve the nutritional status of *Triticum aestivum* L. **PLoS One**, v. 15, n. 12, p. e0241130, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241130>.

JAYA, D. K.; GIYANTO; NURHIDAYAT, N.; ANTONIUS, S. Isolation, identification, and detection of ACC deaminase gene-encoding rhizobacteria from rhizosphere of stressed pineapple. **Indonesian journal of Biotechnology**, v. 24 (1), p. 17-25, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.22146/ijbiotech.39018>.

KARAGÖZ, K.; ATES, F.; KARAGÖZ, H.; KOTAN, R.; ÇAKMALÇI, R. Characterization of plant growth-promoting traits of bacteria isolated from the rhizosphere of grapevine grown in alkaline and acidic soils. **European Journal of Soil Biology**, v. 50, p. 144-150, 2012. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2012.01.007>.

KE, T.; GUO, G.; LIU, J.; ZHANG, C.; TAO, Y.; WANG, P.; XU, Y.; CHEN, L. Improvement of the Cu and Cd phytostabilization efficiency of perennial ryegrass through the inoculation of three metal-resistant PGPR strains. **Environmental Pollution**, v. 271, p. 116314, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116314>.

KHATOON, Z.; HUANG, S.; RAFIQUE, M.; FAKHAR, A.; KAMRAN, M. A.; SANTOYO, G. Unlocking the potential of plant growth-promoting rhizobacteria on soil health and the sustainability of agricultural systems. **Journal of Environmental Management**, v. 273, p. 111118, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.11118>.

KIMURA, M. (1980) A Simple Method for Estimating Evolutionary Rate of Base Substitutions through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-120, 1980. Disponível em: https://doi.org/10.1007/BF01731581>.

KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Milwaukee, v. 22, p. 301-307, 1954.

KUDOYAROVA, G.; ARKHIPOVA, T.; KORSHUNOVA, T.; BAKAEVA, M.; LOGINOV, O.; DODD, I. C. Phytohormone mediation of interactions between plants and non-symbiotic growth promoting bacteria under edaphic stresses. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 1368, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01368>.

KUMAWAT, K. C.; SINGH, I.; NAGPAL, S.; SHARMA, P.; GUPTA, R. K.; SIRARI, A. Co-inoculation of indigenous *Pseudomonas oryzihabitans* and *Bradyrhizobium* sp. modulates the growth, symbiotic efficacy, nutrient acquisition, and grain yield of soybean. **Pedosphere**, v. 32, n. 3, p. 438-451, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.1016/S1002-0160(21)60085-1).

KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M. L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 10, p. 1459-1465, 2007. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S0100-204X2007001000013>.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA Sequencing. In: Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., Eds., Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic, **John Wiley and Sons**, p. 115-175, 1991.

LAU, E. T.; TANI, A.; KHEW, C. Y.; CHUA, Y. Q.; HWANG, S. S. Plant growth-promoting bacteria as potential bio-inoculants and biocontrol agents to promote black pepper plant cultivation. **Microbiological research**, v. 240, p. 126549, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126549>.

LEHMANN, J. Nutrient availability and leaching in an archaeological Anthrosol and a Ferralsol of the Central Amazon basin: fertilizer, manure and charcoal amendments. **Plant and soil**, v. 249, p. 343-357, 2003. Disponível em: https://doi.org/10.1023/A:1022833116184>.

LI, H.; SINGH, R. K.; SINGH, P.; SONG, Q.; XING, Y.; YANG, L.; LI, Y. Genetic diversity of nitrogen-fixing and plant growth promoting *Pseudomonas* species isolated from sugarcane rhizosphere. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1268, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01268>.

LIMA, A. B.; CANNAVAN, F. S.; NAVARRETE, A. A.; TEIXEIRA, W. G.; KURAMAE, E. E.; TSAI, S. M. Amazonian Dark Earth and plant species from the Amazon region contribute to shape rhizosphere bacterial communities. **Microbial ecology**, v. 69, p. 855-866, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00248-014-0472-8>.

MACEDO, R. S.; TEIXEIRA, W. G.; CORRÊA, M. M.; MARTINS, G. C.; VIDAL-TORRADO, P. Pedogenetic processes in anthrosols with pretic horizon (Amazonian Dark Earth) in Central Amazon, Brazil. **PLoS One**, v. 12, n. 5, p. e0178038, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178038>.

MACEDO, R. S.; TEIXEIRA, W. G.; LIMA, H. N.; SOUZA, A. C. G.; SILVA, F. W. R.; ENCINAS, O. C.; NEVES, E. G. Amazonian dark earths in the fertile floodplains of the Amazon River, Brazil: an example of non-intentional formation of anthropic soils in the Central Amazon region. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas**, v. 14, p. 207-227, 2019. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1590/1981-81222019000100013>.

MAHESHWARI, R.; BHUTANI, N.; SUNEJA, P. Isolation and characterization of ACC deaminase producing endophytic Bacillus mojavensis PRN2 from Pisum sativum. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. e2308, 2020. Disponível em: <10.30498/IJB.2020.137279.2308>.

MAIA, R. S.; VASCONCELOS, S. S.; CARVALHO, C. J. R. Frações de fósforo e simbiose micorrízica em floresta secundária em resposta à disponibilidade de água e nutrientes na Amazônia oriental. **Acta amazônica**, v. 45, p. 255-264, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1590/1809-4392201402894>.

MIRZA, M. S.; AHMAD, W.; LATIF, F.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P.; MALI, K. A. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane *in vitro*. **Plant and soil**, v. 237, p. 47-54, 2001. Disponível em: https://doi.org/10.1023/A:1013388619231>.

MORALES-CEDEÑO, L. R.; OROZCO-MOSQUEDA, M. C.; LOEZA-LARA, P. D.; PARRA-COTA, F. I.; SANTOS-VILLALOBOS, S. L.; SANTOYO, G. Plant growthpromoting bacterial endophytes as biocontrol agents of pre-and post-harvest diseases: Fundamentals, methods of application and future perspectives. **Microbiological Research**, v. 242, p. 126612, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126612>.

MOREIRA, H.; PEREIRA, S. I. A.; VEJA, A.; CASTRO, P. M. L.; MARQUES, A. P. G. C. Synergistic effects of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting bacteria benefit maize growth under increasing soil salinity. **Journal of Environmental Management**, v. 257, p. 109982, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109982>.

NAIK, K. MISHRA, S.; SRICHANDAN, H.; SINGH, P. K.; SARANGI, P. K. Plant growth promoting microbes: Potential link to sustainable agriculture and environment. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 21, p. 101326, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101326>.

NKONGOLO, K. K.; NARENDRULA-KOTHA, R. Advances in monitoring soil microbial community dynamic and function. **Journal of applied genetics**, v. 61, n. 2, p. 249-263, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s13353-020-00549-5>.

OLEŃSKA, E.; MALEK, W.; WÓJCIK, M.; SWIECICKA I.; THIJS, S.; VANGRONSVELD, J. Beneficial features of plant growth-promoting rhizobacteria for improving plant growth and health in challenging conditions: A methodical review. **Science of the Total Environment**, v. 743, p. 140682, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140682>.

OLIVEIRA-PAIVA, C. A. et al. Viabilidade técnica e econômica do Biomaphos®(*Bacillus subtilis* CNPMS B2084 e *Bacillus megaterium* CNPMS B119) nas culturas de milho e soja. 2020.

O'NEILL, B.; GROSSMAN, J.; TSAI, M. T.; GOMES, J. E.; LEHMAM, J.; PETERSON, J.; NEVES, E.; THIES, J. E. Bacterial community composition in Brazilian Anthrosols and adjacent soils characterized using culturing and molecular identification. **Microbial ecology**, v. 58, p. 23-35, 2009. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00248-009-9515-y>.

OROZCO-MOSQUEDA, M. D. C.; DUAN, J.; DIBERNARDO, M.; ZETTER, E.; CAMPOS-GARCÍA, J.; GLICK, B. R.; SANTOYO, G. The production of ACC deaminase and trehalose by the plant growth promoting bacterium *Pseudomonas* sp. UW4 synergistically protect tomato plants against salt stress. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 1392, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01392>.

PAGANO, M. C.; RIBEIRO-SOARES, J.; CANÇADO, L. G; FALCÃO, N. P. S.; GONÇALVES, V. N.; ROSA, L. H.; TAKAHASHI, J. A.; ACHETE, C. A.; JORIO, A. Depth dependence of black carbon structure, elemental and microbiological composition in anthropic Amazonian dark soil. **Soil and Tillage Research**, v. 155, p. 298-307, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.still.2015.09.001>.

PARNELL, J. J.; TERRY, R. E.; NELSON, Z. Soil chemical analysis applied as an interpretive tool for ancient human activities in Piedras Negras, Guatemala. **Journal of Archaeological Science**, v. 29, n. 4, p. 379-404, 2002. Disponível em: https://doi.org/10.1006/jasc.2002.0735>.

PEDRINHO, A.; MENDES, L. W.; MERLOTI, L. F.; ANDREOTE, F. D.; TSAI, S. M. The natural recovery of soil microbial community and nitrogen functions after pasture abandonment in the Amazon region. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 96, n. 9, p. fiaa149, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa149>.

QUEIROZ, M. M. A.; HORBE, A. M. C.; SEYLER, P. MOURA, C. A. V. Hidroquímica do rio Solimões na região entre Manacapuru e Alvarães: Amazonas-Brasil. Acta Amazonica, v. 39, p. 943-952, 2009. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S0044-59672009000400022>.

RANA, K. L.; KOUR, D.; KAUR, T.; DEVI, R.; YADAV, A. N.; YADAV, N.; DHALIWAL, H. S.; SAXENA, A. K. Endophytic microbes: biodiversity, plant growth-promoting mechanisms and potential applications for agricultural sustainability. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 113, p. 1075-1107, 2020. Disponível em: ">https://doi.org/10.1007/s10482-020-01429-y>.

ROCHA, A. F. S.; VITORINO, L. C.; BESSA, L. A.; COSTA, R. R. G. F.; BRASIL, M. S.; SOUCHIE, E. L. Soil parameters affect the functional diversity of the symbiotic microbiota of *Hymenaea courbaril* L., a Neotropical fruit tree. **Rhizosphere**, v. 16, p. 100237, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100237>.

ROMERO-GUTIÉRREZ, K. J.; DOURADO, M. N.; GARRIDO, L. M.; OLCHANHESKI, L. R.; MANO, E. T.; DINI-ANDREOTE, F.; VALVANO, M. A.; ARAÚJO, W. L. Phenotypic traits of *Burkholderia* spp. associated with ecological adaptation and plant-host interaction. **Microbiological research**, v. 236, p. 126451, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126451>

SATIRO, J. N. O.; MOTTA, A. C. V.; DEMETRIO, W. C.; SEGALLA, R. F.; CREMONESI, M. V.; ARAÚJO, E. M.; FALCÃO, N. P. S.; MARTINS, G. C.; MUNIZ, A. W.; TAUBE, P. S.; REBELLATO, L.; OLIVEIRA JÚNIOR, R. C.; TEIXEIRA, W. G.; NEES, E. G.; LIMA, H. P.; SHOCK, M. P.; KILLE, P.; CUNHA, L.; NETWORK, T.; BROWN, G. G. Micronutrient availability in amazonian dark earths and adjacent soils. **Geoderma**, v. 395, p. 115072, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2021.115072>. SEGUEL, A.; RUBIO, R.; CARRILLO, R.; ESPINOSA, A.; BORIE, F. Niveles de glomalina y su relación con características químicas y biológicas del suelo (andisol) en un relicto de bosque nativo del sur de Chile. **Bosque (Valdivia)**, v. 29, n. 1, p. 11-22, 2008. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002008000100002>.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v. 160, p. 47-56, 1987. Disponível em: https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9>.

SHEIRDIL, R. A.; HAYAT, R.; ZHANG, X.; ABBASI, N. A.; ALI, S.; AHMED, M.; KHATTAK, J. Z. K.; AHMAD, S. Exploring potential soil bacteria for sustainable wheat (*Triticum aestivum* L.) production. **Sustainability**, v. 11, n. 12, p. 3361, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.3390/su11123361>.

SHETTY, R.; VIDYA, C. S.; PRAKASH, N. B.; LUX, A.; VACULÍK, M. Aluminum toxicity in plants and its possible mitigation in acid soils by biochar: A review. **Science of the Total Environment**, v. 765, p. 142744, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142744.

SILVEIRA, M. I.; OLIVEIRA, E. R.; KEM, D. C.; COSTA, M. L.; RODRIGUES, S. F. S. O sítio Jabuti, em Bragança, Pará, no cenário arqueológico do litoral amazônico. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas**, v. 6, p. 335-345, 2011. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S1981-81222011000200006>.

SOUZA, L. C.; LIMA, H. V.; RODRIGUES, S.; KERN, D. C.; SILVA, A. P.; PICCININ, J. L. Chemical and physical properties of an anthropogenic dark earth soil from Bragança, Para, Eastern Amazon. **Acta Amazonica**, v. 46, p. 337-344, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1590/1809-4392201505663>.

SOUZA, L. C.; SOUZA, L. C.; GALVÃO, A. R. A.; OLIVEIRA, R. L. L.; COSTA, A. V. A.; MOREIRA, A. R.; LIMA, H. V. Caracterização dos atributos químicos de um horizonte antrópico e Gleissolos do nordeste paraense. **Revista Agroecossistemas**, v. 5, n. 2, p. 1-7, 2014. Disponível em: http://dx.doi.org/10.18542/ragros.v5i2.1792>.

STIRK, W. A.; van STADEN, J. Potential of phytohormones as a strategy to improve microalgae productivity for biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, v. 44, p. 107612, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107612>.

SUSILOWATI, D. N.; SUDIANA, I. M.; MUBARIK, N. R.; SUWANTO, A. Species and functional diversity of rhizobacteria of rice plant in the coastal soils of Indonesia. **Indonesian Journal of Agricultural Science**, v. 16, n. 1, p. 39-50, 2015.

TAMARIZ-ANGELES, C.; HUAMÁN, G. D.; PALACIOS-ROBLES, E.; OLIVERA-GONZALES, P.; CASTAÑEDA-BARRETO, A. Characterization of siderophore-producing microorganisms associated to plants from high-Andean heavy metal polluted soil from Callejón de Huaylas (Ancash, Perú). **Microbiological Research**, v. 250, p. 126811, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126811. TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA 6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725–2729. 2013. Disponível em: https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>.

TAPIA-VÁZQUEZ, I.; SÁNCHEZ-CRUZ, R.; ARROYO-DMÍNGUEZ, M.; LIRA-RUAN, V.; SÁNCHEZ-REYES, A.; SÁNCHEZ-CARBENTE, M. R.; PADILLA-CHACÓN, D.; BATISTA-GARCÍA, R. A.; FOLCH-MALLOL, J. L. Isolation and characterization of psychrophilic and psychrotolerant plant-growth promoting microorganisms from a highaltitude volcano crater in Mexico. **Microbiological research**, v. 232, p. 126394, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126394>.

TRIPATHI, A. K.; NAGARAJAN, T.; VERMA, S. C.; RUDULIER, D. Inhibition of biosynthesis and activity of nitrogenase in *Azospirillum brasilense* Sp7 under salinity stress. **Current microbiology**, v. 44, p. 363-367, 2002. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00284-001-0022-8>.

van RAIJ, B.; ANDRADE, J. C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A. **Análise química para avaliação de fertilidade de solos tropicais**. Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, SP, 2001. 285p.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, n. 2–3, p. 127–141, 2001. Disponível em: https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00333-9>.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of the root-nodule bacteria**. IPB HANDBOOK n° 15, London:Blackwell Scientific Publ., 1970. p.164.

WILSON, Clare A.; DAVIDSON, Donald A.; CRESSER, Malcolm S. Multi-element soil analysis: an assessment of its potential as an aid to archaeological interpretation. **Journal of Archaeological Science**, v. 35, n. 2, p. 412-424, 2008. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jas.2007.04.006>.

WRIGHT, S. F.; UPADHYAYA, A. Extraction of an Abundant and Unusual Protein from Soil and Comparison with Hyphal Protein of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. **Soil Science**, Oxford, v. 161, p. 575-586, 1996. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1097/00010694-199609000-00003>.

WRIGHT, S. F.; UPADHYAYA, A. A Survey of Soils for Aggregate Stability and Glomalin, a Glycoprotein Produced by Hyphae of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 198, p. 97-107, 1998. Disponível em: https://doi.org/10.1023/A:1004347701584>.

YOON, S; HA, S.; KWON, S.; LIM, J.; KIM, Y.; SEO, H.; CHUN, J. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and wholegenome assemblies. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 67, n. 5, p. 1613, 2017. Disponível em: <10.1099/ijsem.0.001755>. YOU, M.; FANG, S.; MacDONALD, J.; XU, J.; YUAN, Z. Isolation and characterization of *Burkholderia cenocepacia* CR318, a phosphate solubilizing bacterium promoting corn growth. **Microbiological Research**, v. 233, p. 126395, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126395>.

4 METAGENÔMICA DE UM PERFIL DE TERRA PRETA DA AMAZÔNIA E SEUS ATRIBUTOS FUNCIONAIS

Resumo

Os solos de Terra Preta da Amazônia (TPA) são considerados um reservatório de biodiversidade microbiana ainda pouco conhecida. Desvendar essa caixa preta através do microbioma acessado pelo sequenciamento de alto rendimento permite compreender as funções e contribuições das comunidades microbianas para manter o equilíbrio nesse ecossistema. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade microbiana, metabólica e a presença de genes ativos na TPA por meio do sequenciamento shotgun do DNA metagenômico. O DNA metagenômico foi extraído de 20 amostras, sendo 5 repetições de cada horizonte de TPA (HA, HB e HC) e do solo adjacente (ADJ) utilizando o kit Fast DNA Spin Kit for Soil (MP-BIO) e quantificado em fluorômetro portátil (Qubit 4, Thermo Fisher). As comunidades microbianas foram analisadas por meio do sequenciamento de nova geração na plataforma Illumina NovaSeq 6000 e para as análises de bioinformática foi utilizada a plataforma de acesso livre KBase. A classificação taxonômica revelou que os filos mais abundantes nas amostras foram: Acidobacteria, Proteobacteria, Chloroflexi e Actinobacteria. As principais classes observadas foram: Actinobacteria, Alphaproteobacteria, Acidobacteriia, Deltaproteobacteria e Betaproteobacteria. A maior parte dos bins obtidos nas amostras de Terra Preta do Horizonte A (TPHA) formaram clados sem vizinho conhecido. Apenas os bins 5, 12 e 14 foram posicionados no mesmo ramo das espécies Nitrospira defluvii e Nitrospira moscoviensis. Outros vizinhos sugeridos foram representantes dos gêneros Geobacter uraniireducens e Geobacter sulfurreducens. Nas amostras de Terra Preta Horizonte B (TPHB) os bins 3 e 7 foram agrupados com as espécies Nitrospira defluvii e Nitrospira moscoviensis, respectivamente. Enquanto o bin 6 (TPHB) foi agrupado com Candidatus Koribacter versatillis, representante do filo Acidobacteria. Os bins 12 e 26 da Terra Preta Horizonte C (TPHC) apresentaram similaridade com a espécie Nitrososphaera viennensis, uma arquéia. Os bins 28, 30 e 34 (TPHC) apresentaram similaridade com a espécie Rhodospirilalles bacterium e os bins 17, 27 e 33 (TPHC) foram agrupados com Corynebacterium renale e Microbacterium sp. No solo adjacente, os bins 3, 6 e 20 apresentaram similaridade com uma delta proteobacterium PSCGC 5451, não identificada. O bin 13 foi agrupado com acessos do gênero Bacillus e Lactobacillus. Finalizada a análise taxonômica, as potenciais proteínas presentes nos principais processos metabólicos microbianos a partir dos genomas obtidos foram para as funções: glicólise, via pentose fosfato, ciclo de Krebs, ciclo do glioxalato, ciclo de Calvin, cadeia transportadora de elétrons, enzimas relacionadas ao catabolismo, degradação, modificação e criação de pontes glicosídicas em carboidratos (CAZy). Quanto aos ciclos biogeoquímicos, foi identificada a presença de micro-organismos e genes funcionais relacionados ao metabolismo do nitrogênio, enxofre, carbono e outras redutases, fotossíntese, metanogênese e metanotrofia. Esses resultados apoiam a hipótese de que a TPA é habitada por uma ampla diversidade de micro-organismos capazes de atuar em diferentes vias metabólicas contribuindo para a ciclagem de nutrientes. Além disso, demonstram a importância de se aprofundar nos estudos das comunidades microbianas visto que muitos dos genomas obtidos formaram clados sem vizinhos conhecidos sugerindo a presença de micro-organismos ainda não identificados.

Palavras-chave: Microbioma. Perfil taxonômico. Vias metabólicas. Shotgun.

4 METAGENOMICS OF AN AMAZON TERRA PRETA PROFILE AND ITS FUNCTIONAL ATTRIBUTES

Abstract

Amazonian Dark Earth (ADE) soils are considered a reservoir of microbial biodiversity still poorly known. Unveiling this black box through the microbiome accessed by highthroughput sequencing allows understanding the functions and contributions of microbial communities to maintain the balance in this ecosystem. In this context, the present work aimed to evaluate the microbial and metabolic diversity and the presence of active genes in ADE by shotgun metagenomic DNA sequencing. Metagenomic DNA was extracted from 20 samples, 5 replicates from each ADE horizon (HA, HB and HC) and the adjacent soil (ADJ) using the Fast DNA Spin Kit for Soil (MP-BIO) and quantified in a portable fluorometer (Qubit 4, Thermo Fisher). Microbial communities were analyzed by next-generation sequencing on the Illumina NovaSeq 6000 platform. KBase open acess plataform was used for bioinformatics analysis. Taxonomic classification revealed that the most abundant phyla in the samples were: Acidobacteria, Proteobacteria, Chloroflexi and Actinobacteria. The main classes observed were: Actinobacteria, Alphaproteobacteria, Acidobacteria, Deltaproteobacteria and Betaproteobacteria. Most of the bins obtained from the Dark Earth do Horizon A (DEHA) samples formed clades with no known neighbors. Only bins 5, 12 and 14 were positioned in the same branch as the species Nitrospira defluvii and Nitrospira moscoviensis. Other suggested neighbors were representatives of the genera Geobacter uraniireducens and Geobacter sulfurreducens. In the Dark Earth Horizon B (DEHB) samples bins 3 and 7 were grouped with the species Nitrospira defluvii and Nitrospira moscoviensis, respectively. While bin 6 (DEHB) was grouped with Candidatus Koribacter versatillis, representative of the phylum Acidobacteria. Dark Earth Horizon C (DEHC) bins 12 and 26 showed similarity with the species Nitrososphaera viennensis, an archaea. Bins 28, 30 and 34 (DEHC) showed similarity with the species Rhodospirilalles bacterium and bins 17, 27 and 33 (DEHC) were grouped with Corynebacterium renale and Microbacterium sp. In the adjacent soil, bins 3, 6 and 20 showed similarity with an unidentified proteobacterium delta PSCGC 5451. Bin 13 was grouped with accessions of the genus Bacillus and Lactobacillus. Once the taxonomic analysis was completed, the potential proteins present in the main microbial metabolic processes from the obtained genomes were for the functions: glycolysis, pentose phosphate pathway, Krebs cycle, glyoxalate cycle, Calvin cycle, electron transport chain, enzymes related to catabolism, degradation, modification and creation of glycosidic bridges in carbohydrates (CAZy). Regarding the biogeochemical cycles, the presence of microorganisms and functional genes related to the metabolism of nitrogen, sulfur, carbon and other reductases, photosynthesis, methanogenesis and methanotrophy were identified. These results support the hypothesis that the TPA is inhabited by a wide diversity of microorganisms capable of acting in different metabolic pathways contributing to nutrient cycling. Furthermore, they demonstrate the importance of further studies of microbial communities since many of the genomes obtained formed clades without known neighbors suggesting the presence of microorganisms not yet identified.

Keywords: Microbiome. Taxonomic profile. Metabolic pathways. Shotgun.
4.1 INTRODUÇÃO

A região amazônica é caracterizada pela presença de solos muito intemperizados devido ao regime de inundação, período chuvoso prolongado e mudanças no uso da terra. Esses fatores associados aos baixos teores de matéria orgânica e capacidade de troca de cátions contribuem para a baixa fertilidade dos solos da região (ZIVIANI et al., 2022). Em contrapartida, alguns autores relataram a presença de manchas de solos escuros que apresentam elevada fertilidade, contrastando com a fertilidade natural dos solos da Amazônia e apoiando a hipótese levantada por trabalhos anteriores sobre a presença de comunidades pré-colombianas que contribuíram para a formação da Terra Preta da Amazônia, Terra Preta Antropogênica ou Terra Preta de Índio, através da deposição de resíduos (BARBOSA et al., 2020; KERN et al., 2017; LIMA et al., 2015; ROBINSON et al., 2020).

A deposição dos mais diversos resíduos, de origem animal, vegetal, biocarvão residual das fogueiras e artefatos, deu origem a microsítios formados por Terra Preta ricos em matéria orgânica e nutrientes. Esses resíduos, quando incorporados ao longo do tempo por meio de diferentes processos, foram determinantes para o processo de formação dos solos antropogênicos (PAGANO et al., 2016). A elevada disponibilidade de nutrientes da TPA favorece a presença das mais diversas comunidades microbianas que exercem um importante papel ecológico no solo atuando principalmente na ciclagem de nutrientes (TAKETANI et al., 2013).

As comunidades microbianas do solo podem ser estudadas através de métodos morfológicos, bioquímicos e moleculares. Os estudos através de abordagem morfológica baseiam-se no isolamento e diferenciação dos micro-organismos a partir de características morfofisiológicas. Entretanto, a principal limitação desse tipo de abordagem é isolar uma quantidade representativa de organismos, isso porque somente 1 % dos micro-organismos do solo são facilmente cultiváveis (HUGON et al., 2015). Em relação aos métodos bioquímicos, estes consistem em realizar estimativas da atividade enzimática, biomassa e respiração microbiana por meio de modelos estatísticos. Uma vez que esses métodos são baseados em importantes constituintes celulares, tem como limitação o fato de fornecer informações não apenas de células ativas, mas também aquelas que se encontram em estado inativo. Desta forma, para fins de identificação, as abordagens moleculares têm se destacado pela sensibilidade, especificidade, tempo e eficiência dos resultados obtidos (GEISEN et al., 2019).

A partir da extração de DNA do solo é possível empregar diferentes técnicas para estudar a comunidade microbiana. Para a obtenção de bons resultados é importante garantir

uma extração de boa qualidade, evitando contaminações, remover as impurezas e assim, assegurar a integridade do DNA que será utilizado como base para análises posteriores, como, por exemplo: reação em cadeia da polimerase (PCR), eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição terminal (T-RFLP), sequenciamento de próxima geração (NGS), entre outras (LAGOS et al., 2015). A utilização dessas técnicas permite detectar e quantificar a presença de determinado gene na amostra, a estrutura e composição das comunidades microbianas, como as comunidades microbianas reagem a flutuações ambientais e identificar os organismos presentes na amostra traçando seu perfil filogenético (HARIHARAN et al., 2017; SIMONIN; RICHAUME, 2015; TRABELSI; MHAMDI, 2013).

As tecnologias que envolvem o sequenciamento de próxima geração permitem uma investigação mais profunda sobre as comunidades microbianas do solo a partir de estudos metagenômicos baseados em fragmentos de uma região específica do gene alvo ou do genoma total. A partir dos resultados obtidos é possível conhecer os organismos que compõem determinada comunidade microbiana, suas funções, relações filogenéticas, diversidade funcional e de espécies (YOO et al., 2017). Nos estudos metagenômicos, o gene 16S rRNA e 18S rRNA têm sido utilizados como alvo para entender a diversidade microbiana de diferentes solos ou a influência que a mudança do uso da terra exerce sob as comunidades microbianas (McALLISTER et al., 2018).

O sequenciamento do gene 16S rRNA utilizando o pirosequenciamento ou Illumina são realizados com o auxílio de conjuntos de primers específicos para cada região, sendo as regiões V4-V5 para o pirosequenciamento 454 e V4 para Illumina MiSeq. Ambas as técnicas fornecem como resultado inúmeras sequências do gene em questão contendo vários fragmentos (VANWONTERGHEM et al., 2014). Com o auxílio da bioinformática e os bancos de dados já existentes é possível descobrir de forma rápida, fácil e confiável a diversidade de espécies no solo e demais ambientes. Entretanto, o sequenciamento por meio das técnicas de nova geração apresenta algumas limitações, como, por exemplo: a dificuldade de elucidar os mecanismos funcionais realizados pelas espécies, presença de sequências inespecíficas e até mesmo erros no próprio sequenciamento. Com isso, tornou-se necessário a busca por técnicas de sequenciamento mais eficientes para estudar as comunidades microbianas (BOUGHNER; SINGH, 2016).

O sequenciamento do genoma total através do método *shotgun* nos permite compreender a diversidade microbiana e composição das espécies no solo a partir do DNA total do solo e não de regiões específicas. Para isso, é necessário fragmentar em pequenos pedaços o DNA da amostra de forma aleatória para ser sequenciado através do Illumina HiSeq. A utilização de softwares de bioinformática para montar os fragmentos e analisar as sequências é importante para evitar possíveis erros na identificação dos organismos. Além disso, os bancos de dados são aliados imprescindíveis para conhecer as comunidades microbianas, visto que neles são depositados dados de trabalhos anteriores voltados para a identificação de organismos através de técnicas de sequenciamento (SHARPTON, 2014).

Diante do exposto, a hipótese deste trabalho é que a Terra Preta da Amazônia é habitada por uma ampla diversidade de micro-organismos que atuam em vias metabólicas distintas relacionadas aos ciclos biogeoquímicos. Desta forma, o trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade microbiana e metabólica da TPA por meio do sequenciamento do DNA metagenômico através da técnica de *shotgun* e suas possíveis relações com a ciclagem de nutrientes.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Extração de DNA da Terra Preta da Amazônia e solo adjacente do Pará

O DNA metagenômico de 20 amostras, sendo 5 repetições de cada horizonte da TPA -TPHA, TPHB e TPHC e 5 amostras do solo adjacente – ADJ, foi extraído a partir de 0,5 g de solo utilizando o kit *Fast DNA Spin Kit for Soil* (MP-BIO), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA total extraído foi quantificado em fluorômetro portátil (Qubit 4, Thermo Fisher), utilizando o kit Qubit dsDNA BR para o preparo das amostras. A Tabela 1 apresenta a quantificação (ng. μ L⁻¹) do DNA extraído. Em média, observou-se que maiores quantidades de DNA foram obtidas nas amostras mais superficiais da TPA (horizontes A e B) e do solo ADJ.

Concentração de DNA Total (ng.µL ⁻¹)				
Repetição/Amostr	TPHA	TPHB	TPHC	ADJ
a				
R1	59,6	19,0	2,26	19,0
R2	45,8	16,0	2,0	19,6
R3	40,6	13,3	2,0	16,9
R4	43,2	14,3	2,12	25,0
R5	63,6	24,0	2,28	22,8
Média	50,56	17,32	2,13	20,66

Tabela 1. Concentração de DNA total extraído a partir de 0,5 g das amostras de Terra Preta daAmazônia e solo adjacente do Pará

TPHA – Terra Preta Horizonte A; TPHB – Terra Preta Horizonte B; TPHC – Terra Preta Horizonte C; ADJ – Solo Adjacente.

Em virtude da necessidade de concentração de DNA superior a 20 ng. μ L⁻¹ e quantidade mínima de 200 ng para o preparo das bibliotecas de *shotgun*, uma nova extração de DNA foi realizada a partir de 10 g de solo de duas repetições das amostras TPAHA (R1/R5), TPAHB (R1/R5), TPAHC (R4/R5) e ADJ (R4/R5), utilizando o *Fast DNA Spin Kit for Soil - 50 mL Tubes* (MP-BIO), de acordo com as instruções do fabricante. Além disso, o protocolo do kit possui mais etapas para a remoção de compostos orgânicos e inibidores, proporcionando a obtenção de DNA com maior pureza.

O DNA foi ressuspendido em 5 mL de água deionizada e concentrado 10x em Speed Vac (Eppendorf) a 42 °C, durante 2 horas. Após a concentração, as amostras de DNA foram quantificadas em fluorômetro Qubit (Thermo Fisher), com a utilização do kit Qubit 1X dsDNA High Sensitivity (HS), de acordo com as instruções do fabricante.

Amostra	Concentração de DNA (ng.µL ⁻¹)	Massa total (µg)
TPHAR1	23,2	10,5
TPHAR5	24,0	10,9
TPHBR1	19,9	7,3
TPHBR5	29,0	12,5
TPHCR4	4,16	1,0
TPHCR5	2,69	0,5
ADJR4	23,4	3,8
ADJR5	15,4	2,4

Tabela 2. Concentração de DNA total extraído a partir de 10 g das amostras de Terra Preta da Amazônia e solo adjacente do Pará

TPHAR1 - Terra Preta Horizonte A Repetição 1; TPHAR5 – Terra Preta Horizonte A Repetição 5; TPHBR1 – Terra Preta Horizonte B Repetição 1; TPHBR5 – Terra Preta Horizonte B Repetição 5; TPHCR4 – Terra Preta Horizonte C Repetição 4; TPHCR5 – Terra Preta Horizonte C Repetição 5; ADJR4 – Solo Adjacente Repetição 4; ADJR5 – Solo Adjacente Repetição 5.

O equivalente a 100 ng de DNA das amostras foi aplicado em gel de agarose (1 %) em 0,5x de TAE, sendo realizada eletroforese a 80 V, por 30 minutos. Na primeira linha foram aplicados 2 µL do marcador de peso molecular Ez Load 100 bp PCR Molecular Ruler (Bio-Rad). Após a eletroforese, foi possível visualizar a integridade do DNA extraído das amostras TPHA, TPHB e AJD, porém não foi possível a observação de bandas de DNA na amostra TPHC, dada a menor concentração obtida após a extração. Apesar da não visualização no gel da amostra TPHC, todas as amostras foram encaminhadas para sequenciamento.

Antes do envio para sequenciamento, as amostras de DNA metagenômico foram liofilizadas em liofilizador de bancada modelo Alpha 2-4 LCS Basic (Christ), e encaminhadas em temperatura ambiente para a empresa Novogene (Sacramento, Califórnia-EUA), responsável pela prestação do serviço.

4.2.2 Preparo das bibliotecas de sequenciamento (shotgun)

Para a obtenção de dados de qualidade e resultados fidedignos, diversas etapas de controle foram aplicadas durante o *pipeline* de sequenciamento, iniciando pela avaliação da qualidade do DNA metagenômico, das bibliotecas produzidas e da filtragem dos dados obtidos (Figura 1).





Para a construção das bibliotecas, o DNA metagenômico extraído das amostras foi fragmentado aleatoriamente, as extremidades dos fragmentos foram reparadas e uma cauda poli A foi introduzida, permitindo a ligação do adaptador para a plataforma Illumina. Os fragmentos com os adaptadores foram amplificados por PCR, selecionados por tamanho e purificados (Figura 2). As bibliotecas geradas foram checadas quanto à qualidade utilizando o equipamento Qubit, PCR em Tempo Real (qPCR) e Bioanalyzer. As bibliotecas aprovadas foram agrupadas e sequenciadas na plataforma Illumina NovaSeq 6000, pair-end 150 bp (Illumina, Inc.).



Figura 2. Etapas para a construção das bibliotecas metagenômicas (shotgun)

Para o controle da qualidade dos dados obtidos foram avaliados 4 critérios: (a) Distribuição da qualidade do sequenciamento; (b) Distribuição da taxa de erro; (c) Distribuição das bases A/T/G/C e; (d) Composição dos dados brutos.

Para a avaliação da qualidade das sequências, foi utilizado o parâmetro de qualidade Qscore, que é a relação entre a qualidade da base sequenciada (Qphred), calculado pela equação abaixo, e a taxa de erro do sequenciamento (e),:

$$Qphred = -10 \log_{10}(e)$$

Phred score	Taxa de erro na incorporação da base	Bases corretas	Q-score
10	1/10	90 %	Q10
20	1/100	99 %	Q20
30	1/1000	99,9 %	Q30
40	1/10000	99,9 %	Q40

Tabela 3. Critério para a análise de qualidade das sequências

De acordo com esse critério, quanto maior o Q-score, melhor é a qualidade do sequenciamento, devendo ser removidas sequências da base de dados com Q-score \leq 5. Os resultados mostraram que todas as bibliotecas apresentaram qualidade superior a 30, demonstrando a confiabilidade do sequenciamento e pequena taxa de erro.

Para o presente estudo, somente a primeira premissa deve ser considerada, uma vez que a molécula de molde utilizada foi o DNA ao invés de RNA (RNAseq). Para a redução da incorporação de erros na base de dados, as sequências foram cortadas (trimadas) com tamanho máximo de 150 pares de base. A taxa de erro nas bibliotecas de TPA e solo adjacente cresceu com o aumento do tamanho do fragmento, como esperado, porém não excedeu a taxa de 0,04 %. Para sequenciamento com a plataforma Illumina é esperado um erro < 0,1 %.

Por fim, os dados brutos obtidos após o sequenciamento foram filtrados para a remoção das sequências dos adaptadores, remoção de *reads* contendo ambiguidades (N > 10 %) e *reads* contendo mais de 50 % de bases de baixa qualidade (Q-score \leq 5).

4.2.3 Análises de bioinformática

Para as análises de bioinformática, foi utilizada a plataforma de acesso livre KBase (The Department of Energy Systems Biology Knowledgebase), criada pelo Departamento de Energia dos Estados Unidos (ARKIN et al., 2018).

Primeiramente, as sequências das bibliotecas de TPA e solo ADJ foram importadas para a plataforma KBase, criando uma nova "narrativa". Uma nova análise de qualidade dos dados foi realizada utilizando o *app* "Asses Read Quality with FastQC – v0.11.9". Para a classificação taxonômica inicial dos *reads* foi utilizado o *app* "Classify Taxonomy of Metagenomic Reads with Kaiju – v1.7.3, configurado para todos os níveis taxonômicos e base de dados NCBI BLAST nr+euk.

Após a classificação taxonômica, os *reads* foram clusterizados para a montagem dos contigs, utilizando o app "Assemble Reads with metaSPAdes – v3.15.3", configurado para tamanho mínimo dos contigs em 2.000 pb. Em seguida, os contigs foram agrupados em

genomas individuais putativos ou *bins*, utilizando o app "Bin Contigs using MaxBin2 – v2.2.4", configurado para limite de probabilidade de 0,8, base de marcadores filogenéticos "107 Bacterial Marker Gene Set" e tamanho mínimo do contig de 1.000 pb.

A qualidade dos *bins* gerados foi avaliada utilizando o *app* "Asses Genome Quality with CheckM – v1.0.18". Essa análise avalia a cobertura e contaminações do genoma putativo através do posicionamento de genes de cópia única e genes conservados dentro de uma linhagem filogenética. *Bins* que apresentaram cobertura < 50 % e contaminação > 15 % foram removidos da base de dados utilizando o *app* "Filter Bins by Quality with CheckM- v1.0.18". As sequências dos *bins* filtrados foram extraídas utilizando o *app* "Extract Bins as Assemblies from Binned Contigs – v.1.0.2 e anotadas quando quanto à taxonomia utilizando o *app* "Annotate Multiple Microbial Assemblies with RASTtk – v1.073".

Antes da classificação taxonômica dos *bins*, as bibliotecas das duas repetições de TPA foram aglutinadas para uma única comunidade, por exemplo, TPHAR1 e TPHAR5 foram aglutinadas para TPHA, e assim por diante, utilizando o app "Merge GenomeSets – v1.7.4". A classificação taxonômica dos *bins* foi realizada usando o app "Classify Microbes with GTDB-Tk – v1.7.0", utilizando a base de dados "Genome Taxonomy Database (GTDB), ver R06-RS202". Após classificação, os *bins* foram agrupados em uma árvore filogenética (máxima verossimilhança) com base nas famílias gênicas universais definidas por COG (*Cluster of Orthologous Groups*), utilizando o app "Insert Set of Genomes Into Species Tree – v2.2.0".

Finalizada a análise taxonômica dos *bins* agrupados, foi realizada a anotação dos genomas com base na funcionalidade, utilizando o *app* "Annotate and Distill Genomes with DRAM". Esta *app* gera um resumo das funções metabólicas e estruturais nos genomas putativos (MAGs), a partir das sequências codificadoras dos possíveis genes identificados e diversas bases de dados (SHAFFER et al., 2020). São anotadas potenciais proteínas presentes nos principais processos metabólicos microbianos (Module), Cadeia Transportadora de Elétrons (ETC complexes I, II, III, IV high affinity, IV low affinity e V), enzimas relacionadas ao catabolismo, degradação, modificação e criação de pontes glicosídicas em carboidratos (CAZy) (HUANG et al., 2018), metabolismo do nitrogênio, enxofre, outras redutases, fotossíntese, metanogênese e metanotrofia (SHAFFER et al., 2020).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Sequenciamento (shotgun)

A Tabela 4 apresenta o número total de *reads* obtidos por biblioteca metagenômica e resumos dos principais critérios de qualidade avaliados. O maior número de sequências brutas foi obtido na amostra ADJR4 (123 milhões) e a menor quantidade na amostra TPHBR1 (88 milhões). A amostra ADJR5 não passou nos critérios de qualidade e foi descartada da base de dados.

Tabela 4. Resumo dos parâmetros de qualidade para as sequências obtidas apóssequenciamento de bibliotecas de Terra Preta da Amazônia e solo adjacente do Pará

Amostra	Nº de sequências brutas	Efetividade (%)	Erro (%)	Q30 (%)	GC (%)
TPHAR1	92.252.272	99.85	0.03	92.11	58.31
TPHAR5	121.294.364	99.84	0.03	93.19	58.16
TPHBR1	88.424.704	99.85	0.03	93.51	59.57
TPHBR5	101.607.206	99.82	0.03	92.02	61.71
TPHCR4	110.970.548	99.64	0.03	91.23	61.35
TPHCR5	103.359.248	99.66	0.03	89.98	59.61
ADJR4	123.430.862	99.51	0.03	89.76	62.39

TPHAR1 - Terra Preta Horizonte A Repetição 1; TPHAR5 – Terra Preta Horizonte A Repetição 5; TPHBR1 – Terra Preta Horizonte B Repetição 1; TPHBR5 – Terra Preta Horizonte B Repetição 5; TPHCR4 – Terra Preta Horizonte C Repetição 4; TPHCR5 – Terra Preta Horizonte C Repetição 5; ADJR4 – Solo Adjacente Repetição 4; Q30 – Q-score 30; GC – Conteúdo de guanina e citosina.

A Tabela 5 apresenta um resumo do número de sequências válidas, tamanho das sequências e porcentagem de GC da base de dados utilizada para as análises de bioinformática.

Amostra	Nº de sequências válidas	Tamanho das sequências	GC %
TPHAR1	46123136	150	58
TPHAR5	60647182	150	58
TPHBR1	44212352	150	59
TPHBR5	50803603	150	61
TPHCR4	55485274	150	61
TPHCR5	51679624	150	59
ADJR4	61715431	150	62

Tabela 5. Resumo da base de dados válida utilizada para bioinformática de Terra Preta da Amazônia e solo adjacente do Pará

TPHAR1 - Terra Preta Horizonte A Repetição 1; TPHAR5 – Terra Preta Horizonte A Repetição 5; TPHBR1 – Terra Preta Horizonte B Repetição 1; TPHBR5 – Terra Preta Horizonte B Repetição 5; TPHCR4 – Terra Preta Horizonte C Repetição 4; TPHCR5 – Terra Preta Horizonte C Repetição 5; ADJR4 – Solo Adjacente Repetição 4; GC – Conteúdo de guanina e citosina.

4.3.2 Classificação taxonômica

As Figuras 3 a 8 apresentam as classificações taxonômicas dos *reads* nos diversos níveis (filo, classe, ordem, família, gênero e espécie). No topo das figuras é possível observar em destaque a porcentagem de *reads* que foram classificados, sendo grande parte não classificada dentro dos níveis taxonômicos. Os filos mais abundantes nas amostras foram: Acidobacteria, Proteobacteria (Pseudomonadota), Chloroflexi e Actinobacteria. Foi observada a maior incidência de Archaeas nas amostras de TPA, principalmente dos filos Candidatus Bathyarchaeota, Euryarchaeota e Thaumarchaeota e do filo de Bactéria, Canditatus Rokubacteria (Figura 3).



Figura 3. Classificação taxonômica dos reads obtidos da Terra da Amazônia e solos adjacente do Pará ao nível de filo

As principais classes observadas foram: Actinobacteria, Alphaproteobacteria, Acidobacteriia, Deltaproteobacteria, Gammaproteobacterias, Betaproteobacteria, Ktedonobacteria e Planctomycetia, sendo a classe Ktenodobacteria mais presente nas amostras TPHC (Figura 4). Na TPA, as principais ordens observadas foram: Rhizobiales, Acidobacteriales, Ktedonobacterales, Streptomycetales e Burkholderiales. No solo adjacente foi possível observar a presença da ordem Rhodospirillales (Figura 5).



Figura 4. Classificação taxonômica dos reads obtidos da Terra da Amazônia e solos adjacente do Pará ao nível de classe





Ao nível taxonômico de família as amostras ADJ e TPHC apresentam maior diversidade, destacando-se as famílias: Acidobacteriaceae, Streptomycetaceae, Solibacteriaceae e Bradyrhizobiaceae (Figura 6). Não foi possível identificar a maior parte das sequências das amostras de TPA ao nível de gênero, sendo observado o predomínio dos gêneros: *Streptomyces, Bradyrhizobium, Candidatus Sulfopaludibacter* e *Candidatus Sulfopaludibacter*. *Actinomadura* foram identificados no solo ADJ e TPHC, enquanto *Ktenodobacter* na TPHC (Figura 7).

Figura 6. Classificação taxonômica dos reads obtidos da Terra da Amazônia e solos adjacente do Pará ao nível de família





Figura 7. Classificação taxonômica dos reads obtidos da Terra da Amazônia e solos adjacente do Pará ao nível de gênero

Ao nível de espécie, foram identificadas *Acidobacteria bacterium* em todas as amostras, *Chloroflexi bacterium, Candidatus Bathyarchaeota* archeon e Terrabacteria group bacterium ANGP1 em maior abundância na TPA. No solo ADJ, foi possível identificar ainda *Actinobacteria bacterium, Alphaproteobacteria bacterium, Gammaproteobacteria bacterium,* e *Planctomycetes bacterium* (Figura 8). Observa-se a grande presença de grupos taxonômicos "candidatos" e espécies de bactérias e arqueias pouco descritas na literatura, demonstrando o potencial da TPA em abrigar novos micro-organismos ainda pouco estudados.



Figura 8. Classificação dos reads obtidos da Terra da Amazônia e solos adjacente do Pará ao nível de espécie

O maior número de *bins* foram obtidos na amostra TPHCR4 (71) e o menor na amostra ADJR4 (30) (Tabela 6). Ressalta-se que nas amostras de TPA, a maior parte dos contigs não formaram *bins*, indicando a presença de possíveis novos organismos cujo genomas não foram mapeados, diferentemente no solo ADJ, onde 66,3 % dos contigs foram agrupados em *bins* (Tab. 6).

Amostro	Bin	Contig	Binned	Unbinned	Soma dos Contigs	Soma dos Contigs
Amostra	S	S	Contigs	Contigs	agrupados	não agrupados
TPHAR1	45	60663	23750 (39.2 %)	36913 (60.8 %)	115622908 (38.3%)	185936047 (61.7%)
TPHAR5	47	74863	28211 (37. 7%)	46652 (62.3 %)	135758950 (35.5%)	246893058 (64.5%)
TPHBR1	51	65049	23157 (35.6 %)	41892 (64.4 %)	128630845 (36.6%)	222543806 (63.4%)
TPHBR5	49	61799	22125 (35.8 %)	39674 (64.2 %)	111777252 (35.2%)	205380036 (64.8%)
TPHCR4	71	83549	36582 (43.8 %)	46967 (56.2 %)	195575712 (42.5%)	264421725 (57.5%)
TPHCR5	58	74157	33789 (45.6 %)	40368 (54.4 %)	183791487 (48.2%)	197442284 (51.8%)
ADJR4	30	35900	23790 (66.3 %)	12110 (33.7 %)	90807854 (65.4%)	48021996 (34.6%)

Tabela 6. Resumo dos resultados do agrupamento dos contigs (binning) em genomas individuais putativos de Terra Preta da Amazônia e solo adjacente do Pará

TPHAR1 - Terra Preta Horizonte A Repetição 1; TPHAR5 – Terra Preta Horizonte A Repetição 5; TPHBR1 – Terra Preta Horizonte B Repetição 1; TPHBR5 – Terra Preta Horizonte B Repetição 5; TPHCR4 – Terra Preta Horizonte C Repetição 4; TPHCR5 – Terra Preta Horizonte C Repetição 5; ADJR4 – Solo Adjacente Repetição 4.

Tabela 7. Número total de bins e bins filtrados (cobertura < 50 % e contaminação > 15 %) obtidos de Terra Preta da Amazônia e solo adjacente do Pará

Amostra	Bins gerados	Bins filtrados
TPHAR1	45	12
TPHAR5	47	16
TPHBR1	51	10
TPHBR5	49	09
TPHCR4	71	16
TPHCR5	58	18
ADJR4	30	10

TPHAR1 - Terra Preta Horizonte A Repetição 1; TPHAR5 – Terra Preta Horizonte A Repetição 5; TPHBR1 – Terra Preta Horizonte B Repetição 1; TPHBR5 – Terra Preta Horizonte B Repetição 5; TPHCR4 – Terra Preta Horizonte C Repetição 4; TPHCR5 – Terra Preta Horizonte C Repetição 5; ADJR4 – Solo Adjacente Repetição 4.

A maior parte dos *bins* obtidos na TPHA formaram clados sem um vizinho conhecido (Figura 9). Apenas os *bins* 14 (TPHAR5), 12 e 5 (TPHAR1) foram posicionados no mesmo ramo das espécies *Nitrospira defluvii* e *Nitrospira moscoviensis*. Outros vizinhos sugeridos foram representantes dos gêneros *Geobacter* sp., *Geobacter uraniireducens* e *Geobacter sulfurreducens*.

Figura 9. Árvore filogenética (máxima verossimilhança) dos bins obtidos na biblioteca do horizonte A de Terra Preta da Amazônia (TPHA) do Pará



Os *bins* 3 (TPHBR5) e 7 (TPHBR1) também foram agrupados com os gêneros *Nitrospira defluvii* e *Nitrospira moscoviensis* (Figura 10). O *bin* 6 (TPHBR1) foi agrupado com o representante do filo Acidobacteria, Candidatus *Koribacter versatillis* Ellin345.

Figura 10. Árvore filogenética (máxima verossimilhança) dos bins obtidos na biblioteca do horizonte B de Terra Preta da Amazônia (TPHB) do Pará



No caso da TPHC, os *bins* 6, 12 (TPHCR5) e 26 (TPHCR4) apresentaram similaridade com a espécie *Nitrososphaera viennensis*. Os *bins* 28, 30 (TPHCR4) e 34 (TPHCR5) apresentaram similaridade com a bactéria *Rhodospirilalles bacterium*. Já os *bins* 17, 27 (TPHCR4) e 33 (TPHCR5) foram agrupados no mesmo ramo que as bactérias Actinomycetes: *Corynebacterium renale* e *Microbacterium sp.* (Figura 11).

Figura 11. Árvore filogenética (máxima verossimilhança) dos bins obtidos na biblioteca do horizonte C de Terra Preta da Amazônia (TPHC) do Pará



No solo adjacente, os *bins* 3, 6 e 20 apresentaram similaridade com uma delta proteobacterium PSCGC 5451, não identificada. O *bin* 13 foi agrupado com acessos do gênero *Bacillus* e *Lactobacillus*, além da bactéria *Calditerricola satsumensis*. O *bin* 10 apresentou similaridade com o Actinomycetes *Kutzneria*, *Microbacterium* e *Promicromonosporaceae*

bacterium, além da Coriobacteriia, *Gordonibacter pamelaeae*. O *bin* 26 apresentou similaridade com *Deinococcus* sp. UR1 e o bin 17 com bactérias do gênero *Mycoplasma* (Figura 12).

Figura 12. Árvore filogenética (máxima verossimilhança) dos bins obtidos na biblioteca do solo adjacente (ADJ) do Pará



4.3.3 Metabolismo microbiano

O perfil metabólico da amostra TPHA apresentou principalmente potenciais proteínas relacionadas à glicólise, via pentose fosfato, ciclo de Krebs, ciclo do glioxalato, ciclo de Calvin, ciclo de Amon-Buchanan (quimioautotrofía). Em relação à cadeia transportadora de elétrons, foram identificadas enzimas putativas como: NADH (quinone oxirredutase), succinato desidrogenase, fumarato redutase, citocromos bc1, bd, c e ATPases.

No ciclo dos carboidratos, foi identificada uma celulose amorfa e uma glucana de ligação mista. No metabolismo do N foram identificadas enzimas putativas dos processos de nitrificação, desnitrificação e fixação biológica de N. No ciclo do enxofre foram identificadas proteínas putativas relacionadas à redução dissimilatória do enxofre (genes *dsr*A ou *drs*B) e oxidação do tiossulfato em sulfato (complexo SOX). Além disso, foi identificada uma enzima envolvida na redução do mercúrio (E.C: 1.16.1.1.). No ciclo do metano foram identificadas enzimas putativas para conversão do acetato em metano. Também foram reconhecidas enzimas associadas a conversão de álcoois e ácidos graxos de cadeia curta, como álcool desidrogenase (Figura 13).

Figura 13. Mapa metabólico microbiano anotado na biblioteca do horizonte A de Terra Preta da Amazônia (TPAHA) do Pará





Figura 13. Mapa metabólico microbiano anotado na biblioteca horizonte A de Terra Preta da Amazônia (TPAHA) do Pará

O perfil metabólico da amostra TPHB também apresentou potenciais proteínas relacionadas à glicólise, via pentose fosfato, ciclo de Krebs, ciclo do glioxalato, ciclo de Calvin, ciclo de Amon-Buchanan. Em relação à cadeia transportadora de elétrons, foram identificadas enzimas putativas como: NADH (quinone oxirredutase), succinato desidrogenase, fumarato redutase, citocromos bc1, bd, c e ATPases, assim como na TPHA.

No ciclo dos carboidratos, foram identificadas somente a celulose amorfa e glucana de ligação mista. Quanto ao metabolismo do N, foram identificadas enzimas putativas dos processos de nitrificação (oxidação de amônia), desnitrificação pela redução do nitrito em óxido nitroso, redução dissimilatória do nitrito em amônia (DNRA) e redução do óxido nítrico em oxido nitroso. No ciclo do enxofre, apenas a enzima responsável pela oxidação do tiossulfato em sulfato (complexo SOX) foi identificada. Também foram identificadas enzimas envolvidas na redução do mercúrio (E.C: 1.16.1.1.) e do arsenato (E.C. 1.20.4.1). No ciclo do metano, foram identificadas enzimas putativas para conversão do acetato em metano. Também foram reconhecidas enzimas associadas a conversão de álcoois e ácidos graxos de cadeia curta, como álcool desidrogenase e conversão do piruvato em Acetil-CoA (Fig. 14).







Figura 14. Mapa metabólico microbiano anotado na biblioteca horizonte B de Terra Preta da Amazônia (TPAHB) do Pará

O perfil metabólico e da cadeia transportadora de elétrons, na amostra TPHC, foi bastante similar aos outros dois perfis da TPA. No ciclo dos carboidratos, além da celulose amorfa e glucana de ligação mista, foram identificadas enzimas degradadoras de xiloglucanas e arabinose, podendo ter aplicação biotecnológica na produção de etanol de segunda geração.

No metabolismo do N, foram identificadas enzimas putativas dos processos de nitrificação (genes amoA, hao, nxrA), desnitrificação e fixação de N (redução do N em amônio). No ciclo do enxofre, foram identificadas proteínas putativas relacionadas à redução dissimilatória do enxofre (genes dsrA ou drsB), tiossulfato redutase (genes phsA e psrA) e oxidação do tiossulfato em sulfato (complexo SOX). Também foram identificadas enzimas envolvidas na redução do mercúrio (E.C: 1.16.1.1.) e do arsenato (E.C. 1.20.4.1). No ciclo do metano, foram identificadas principalmente enzimas putativas para conversão do acetato em metano e conversão do metano em metanol (*pmoA*). Também foram reconhecidas enzimas associadas a conversão de álcoois e ácidos graxos de cadeia curta, como álcool desidrogenase e conversão do piruvato em Acetil-CoA, D-lactato desidrogenase, acetato e butirato kinases (Fig. 15).

Figura 15. Mapa metabólico microbiano anotado na biblioteca horizonte C de Terra Preta da Amazônia (TPAHC) do Pará





Figura 15. Mapa metabólico microbiano anotado na biblioteca horizonte C de Terra Preta da Amazônia (TPAHC) do Pará

O perfil metabólico no solo ADJ também apresentou potenciais proteínas relacionadas à glicólise, via pentose fosfato, ciclo de Krebs, ciclo do glioxalato, ciclo de Calvin, ciclo de Amon-Buchanan. Em relação à cadeia transportadora de elétrons, foram identificadas enzimas putativas como: NADH (quinone oxirredutase), succinate desidrogenase, citocromos bc1, bd, c e ATPases.

No ciclo dos carboidratos, além da celulose amorfa e glucana de ligação mista, também foram identificadas enzimas degradadoras de xiloglucanas e arabinose, assim como na TPHC.

No metabolismo do N, somente foram identificadas enzimas putativas dos processos de nitrificação (gene hao) e desnitrificação (redução do nitrito em óxido nítrico e redução do óxido nítrico em óxido nitroso). Não foram identificadas enzimas relacionadas ao ciclo do enxofre e redutases de outros metais, como observado na TPA.

No ciclo do metano, foram identificadas enzimas putativas para conversão do acetato em metano e conversão da trimetilamina em dimetilamina. Também foram reconhecidas enzimas associadas do piruvato em Acetil-CoA, acetato quinase, propionato CoA transferase e álcool desidrogenase (Fig. 16).



Figura 16. Mapa metabólico microbiano anotado na biblioteca do solo adjacente (ADJ) do Pará



Figura 16. Mapa metabólico microbiano anotado na biblioteca do solo adjacente (ADJ) do Pará

4.4 DISCUSSÃO

O solo abriga uma ampla diversidade de micro-organismos ainda pouco conhecida. O sequenciamento de alto rendimento a partir do DNA de alta qualidade tem sido utilizado como ferramenta de estudo para acessar as comunidades microbianas no solo, entender suas vias metabólicas e respostas a flutuações ambientais em uma dimensão de detalhes inexistentes na literatura ou pouco estudada (DELMONT et al., 2012). O predomínio de representantes do domínio Bacteria pode ser atribuído ao desbalanço das sequências nos bancos de dados, fazendo com que haja uma menor proporção dos domínios Eukarya e Archaea conforme foi verificado no presente estudo. Além disso, as sequências não classificadas podem pertencer a esses domínios que apresentaram menos representantes (SOUZA et al., 2013).

Na análise metagenômica de diferentes solos foi identificada a predominância dos filos Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia, Bacteroidetes, Chloroflexi, Planctomycetes, Gemmatimonadetes e Firmicutes, sendo Proteobacteria o filo dominante e mais abundante (DELMONT et al., 2012; JANSSEN, 2006; ROESCH et al., 2007; SOUZA et al., 2013; YIN et al., 2010). A diferença entre os filos identificados pode ser explicada pela complexa diversidade microbiana e o ambiente de estudo, bem como a presença de regiões limitantes para a montagem do genoma (DELMONT et al., 2012). Os resultados do presente trabalho corroboram com estudos anteriores, diferindo apenas em relação ao filo predominante que nesse caso foi Acidobacteria, o que pode ser justificado pelo pH ácido dos solos de Terra Preta da Amazônia e solo adjacente. Navarrete et al. (2013), avaliaram a abundância do filo Acidobacteria em solos da Amazônia e observaram que esse grupo de bactérias se correlaciona de forma positiva com altos teores de alumínio no solo e pH elevado, condições relatadas no presente estudo, sugerindo a utilização das acidobactérias como indicadoras de mudanças no uso da terra relacionadas a conversão da floresta em terras agrícolas.

Dentro do filo Proteobacteria, Alphaproteobacteria é a classe mais abundante no solo com destaque para a ordem Rhizobiales, composta por importantes representantes relacionados ao ciclo do nitrogênio, como por exemplo: *Rhizobium, Bradyrhizobium* e *Nitrobacter*. No presente estudo, o gênero *Bradyrhizobium* foi encontrado demonstrando o potencial desses solos para a fixação biológica de nitrogênio. A presença da ordem Rhodospirillales no solo adjacente sugere as contribuições desse solo não só para a fixação biológica de nitrogênio como também para a promoção de crescimento vegetal, uma vez que um dos representantes dessa ordem são bactérias pertencentes ao gênero *Azospirillum* (HUNGRIA et al., 2010). *Rhodospirillalles bacterium* é uma bactéria púrpura não sulfurosa, que pode utilizar ácidos

orgânicos para crescimento fotossintético, com grande potencial biotecnológico, como a produção de biohidrogênio (ASIF; MOHSIN; REHMAN, 2021).

A ocorrência da ordem Burkholderiales (Betaproteobacteria) nos solos do presente estudo demonstra a importância e potencial biotecnológicos desses solos. Os micro-organismos pertencentes a essa ordem desempenham importantes funções no solo, tais como: controle biológico, promoção de crescimento de plantas e fixação biológica de nitrogênio confirmada pela presença do gene *nif*HDK (COENYE; VANDAMME, 2003; GYANESHWAR et al., 2011; SANTOS; BUSTILLOS-CRISTALES; CABALLERO-MELLADO, 2001). As espécies *Nitrospira defluvii* e *Nitrospira moscoviensis* pertencentes a ordem Nitrosomonadales foram identificadas nas amostras do horizonte A e pertencem ao grupo de bactérias conhecidas pela oxidação do nitrito a nitrato, na segunda etapa do processo de nitrificação (NOWKA et al., 2015) sugerindo contribuições da microbiota do solo de TPA na disponibilidade de N.

Foti et al. (2007) e Hori et al. (2010) relataram a capacidade de Deltaproteobacterias reduzir sulfato e ferro, sendo estes utilizados como fonte de nutrientes para os microorganismos e as plantas. As espécies *Geobacter* sp., *Geobacter uraniireducens* e *Geobacter sulfurreducens*, identificados nas amostras do horizonte A, são conhecidas pela sua capacidade de oxidação da matéria orgânica, redução de metais (Fe) e enxofre, produção de eletricidade, transporte de elétrons e metilação de mercúrio. Além disso, em condições de anaerobiose, essas bactérias têm sido amplamente estudadas acerca das suas contribuições nas vias de emissão de gases do efeito estufa (GEE) através de reações redox (LI; ZHOU, 2020). A espécie *G. sulfurreducens* foi apontada como potencial candidata para o desenvolvimento de tecnologias de eletrossíntese microbiana, sendo capaz de doar elétrons para eletrodos, como uma bateria híbrida (TEIXEIRA et al., 2022)

O filo Acidobacteria foi dominante nas amostras do presente estudo, encontrado no horizonte B da Terra Preta da Amazônia do Pará, esses resultados corroboram com o trabalho realizado por Navarrete et al. (2010), onde os autores avaliaram a composição da comunidade microbiana em um solo de Terra Preta da Amazônia e a influência do teor de biocarvão sob as bactérias do solo, sendo Acidobacteria o segundo filo dominante, ficando atrás apenas de Proteobacteria. Candidatus *Koribacter versatillis* Ellin345 (Acidobacteriales), é uma bactéria gram-negativa, aeróbica e heterotrófica, a qual está envolvida no metabolismo de carboidratos da família das enzimas ativas (CAZy) e é capaz de crescer em diversos tipos de açúcares, polímeros e ácidos orgânicos. Essa bactéria já foi isolada em solo de pastos na Austrália, tundra ártica e solo rizosférico de mostarda, sendo bastante comum no solo (LIU et al., 2021; RAWAT et al., 2012; SAIT et al., 2002). As bactérias *Kutzneria* sp. e *Promicromonosporaceae*

bacterium (Actinobacteria) identificadas no solo adjacente são espécies promotoras de crescimento vegetal de elevado potencial biotecnológico, sendo capazes de produzir diferentes metabolitos: celulases, fosfatases, amilases, amônia, lipases, sideróforos, proteases e AIA. Bousselham et al. (2022) e Devi et al. (2021) destacaram a importância da bactéria *Kutzneria* sp, na produção de antibiótico, evidenciando a importância de cepas pertencentes à ordem Actinomycetales e suas contribuições para melhorar o desenvolvimento das plantas conferindo maior resistência sistêmica e evitando o ataque de patógenos.

A classe Bacilli apresenta muitos representantes de importância ecológica demonstrando a possível relação existente entre a composição dos resíduos e a influência da deposição desses resíduos na formação dos solos antropogênicos. Dentre eles, a espécie *Lactobacillus pantheris*, presente no solo adjacente do Pará, é uma bactéria gram-positiva, anaeróbia facultativa que não produz gás durante a fermentação da glicose e foi isolada de fezes de onça (LIU; DONG, 2002). Já *Lactobacillus acidipiscis*, também encontrada no solo adjacente, foi primeiramente isolada de peixes fermentados, e, durante o processo de fermentação da glicose, a bactéria produz maiores quantidades de ácido L-lático do que D-lático (RODPAI et al., 2021).

A identificação do *Bacillus boroniphilus* no solo adjacente pode ser associada à presença de boro (B) no respectivo solo. A bactéria foi isolada pela primeira vez de um solo da Turquia, sendo comprovada a dependência de B para o seu desenvolvimento, bem como a capacidade de tolerar concentrações acima de 450 mM de B (AHMED, YOKOTA e FUJIWARA, 2007). Também no solo adjacente foi identificado o *Bacillus coahuilensis*, fato que pode ser associado ao teor de sódio. A bactéria é uma halófila que desenvolveu diferentes estratégias adaptativas para a aquisição de fósforo em ambientes com condições limitantes desse nutriente (GÓMEZ-LUNAR et al., 2016), bem como a capacidade de resistência a ambientes salinos (DELGADO-GARCIA et al., 2018).

A Coriobacteriia, *Gordonibacter pamelaeae*, está presente na microbiota intestinal e foi isolada de fezes humanas (SELMA et al., 2017), sugerindo a participação antrópica na formação dos solos de TPA. Além disso, *G. pamelaeae* apresenta sequências que permitem inferir a capacidade de transferência lateral do gene *nif*H (GTARI et al., 2011). A *Nitrososphaera viennensis* (Thaumarchaeota), presente no horizonte C do solo de Terra Preta do Pará, é uma arqueia aeróbica, mesofílica e oxidante de amônia (presença do gene AOA), de grande importância para o ciclo do nitrogênio isolada de solo de jardim na Áustria (STIEGLMEIER, et al., 2014; TOURNA et al., 2011).

A presença de moléculas ligadas ao ciclo de carboidratos complexos sugere a capacidade dos micro-organismos de mineralização desses carboidratos, utilizando como fonte de carbono, atuando também na decomposição da matéria orgânica e consequentemente liberando nutrientes para as plantas. Estudar a participação dos micro-organismos nos ciclos biogeoquímicos permite compreender suas atribuições e como, ao longo do tempo, eles desenvolveram estratégias adaptativas para continuar desempenhando suas funções ecológicas, mesmo diante das mudanças que ocorrem nos ambientes (FONSECA et al., 2018). Andrade et al. (2017) realizaram um estudo em dois ambientes diferentes a fim de compreender como os micro-organismos atuam no ciclo do carbono levando em consideração as enzimas ativas de carboidratos (CAZymes). As enzimas são responsáveis pela quebra e biossíntese de carboidratos, além de despertar interesse biotecnológico e ambiental devido aos papéis ecológicos desempenhados por diferentes micro-organismos (ANDRÉ et al., 2014).

No solo, uma das adaptações de sobrevivência desenvolvidas pelas bactérias é a capacidade de utilizar diferentes fontes de energia (BONNET et al., 2020). Desta forma, em condições aeróbicas algumas bactérias, conhecidas como metanotróficas ou oxidantes de metano (CH₄), presentes no solo de TPA, realizam a oxidação do CH₄ utilizando a molécula como única fonte de carbono e energia (VENTURINI et al., 2022). Para oxidar o metano, as bactérias metanotróficas utilizam a enzima metano monooxigenase particulada que é codificada pelo gene *pmoA*, identificado no horizonte C do perfil de Terra Preta da Amazônia (KNIEF, 2015). Sengupta; Dick (2017) sugeriram que a atividade de bactérias metanotróficas pode ser afetada pela concentração de metano à medida que o gás é produzido no solo e liberado para a atmosfera. Além disso, vale ressaltar a importância do regime chuvoso da região amazônica que impacta diretamente na umidade do solo e consequentemente no ciclo do metano.

No presente trabalho, foram identificados grupos microbianos e genes ativos relacionados aos ciclos biogeoquímicos. Os procariotos participam ativamente do ciclo do enxofre (S) por meio de processos de oxidação e redução, podendo impactar o ciclo do carbono, nitrogênio, e acarretar em mudanças globais (VENTURINI et al., 2022). Yu et al. (2020) realizaram um estudo baseado em um banco de dados de genes envolvidos no ciclo do S. Para acessar esses genes têm sido utilizadas técnicas de sequenciamento de última geração devido a confiabilidade dos dados obtidos, tais genes codificam para oxidação (*fcc, sqr, dox, glp, sse, tsd, soe* e *sor*), redução (*asr, mcc, fsr, otr, ttr, ser, psr, hyd, timid, rdl* e *sud*), redução assimilatória (*cys, sat* e *sir*), redução e oxidação dissimilatória (*apr, qmo* e *dsr*), sistemas SOX (*sox*) transformação (*dsy, ddd, dmd, acul, acu, prp, dms, ddh, tmm, sqd, yih, tau, toa, tpa, ise, xsc, pta, hps, slc* e *beta*) e desproporcionamento (*phs, tet* e *sor*).

Nas amostras dos horizontes A e C foi relatada a presença do gene *dsr*, enquanto proteínas relacionadas ao complexo SOX foram relatadas nos horizontes A, B e C da Terra Preta demonstrando a diversidade metabólica funcional e a possibilidade de utilização de diferentes vias para acessar o ciclo do enxofre nesses solos. A oxidação de compostos inorgânicos ocorre através do complexo de enzimas de oxidação do enxofre, SOX, presente em bactérias anaeróbias (fototróficas) e aerobias (quimiotróficas) (ROTHER et al., 2005). Além disso, um complexo composto por 15 genes *sox* e *dsr* codificam para a oxidação do S atuando através de múltiplas vias. A presença dos genes sox confere aos micro-organismos características quimiotróficas tendo como fonte essencial de energia o tiossulfato. Entretanto, a expressão desses genes está condicionada à presença da tiorredoxina, uma proteína periplasmática. Já os genes do complexo *dsr* atuam na oxidação anaeróbica do enxofre por meio de bactérias fototróficas e fotoautotróficas (FRIEDRICH et al., 2005).

No horizonte C do perfil de Terra Preta da Amazônia foram identificados os genes *phsA* e *psrA* ambos relacionados ao ciclo do enxofre. A transformação de tiossulfato em sulfito e sulfeto se dá com o auxílio da enzima tiossulfato redutase sendo o gene *phsA* utilizado como alvo para o estudo desse mecanismo. Outra via estudada no ciclo do S é a redução do polissulfeto sendo *psrA* o gene alvo (YU et al., 2020), tanto o gene *phsA* quanto o gene *psrA* foram encontrados no horizonte C do perfil de Terra Preta sugerindo a presença de micro-organismos que participam do ciclo do S. O estudo realizado por Yu et al. (2020) revelou algumas dificuldades para identificar e autenticar a presença de genes envolvidos no ciclo do enxofre, mas salientou a importância de conhecer quem são os micro-organismos que estão no solo e quais seus respectivos papéis e contribuições para a ecologia microbiana.

A presença dos genes *amoA* e *nxrA* nos solos de TPA sugerem relações homólogas com o gene *hao*, diversidade funcional e taxonômica dos grupos microbianos garantindo a ciclagem do nitrogênio. No processo de nitrificação os genes relacionados a oxidação são: *amoA* que codifica para a enzima amônia monooxigenase oxida amônia (NH₃) a hidroxilamina. Já *hao* codifica para a hidroxilamina desidrogenase oxidando hidroxilamina a nitrito (NO⁻²) e *nxr* codifica para a nitrito oxidoredutase, convertendo nitrito em nitrato (NO⁻³). No processo de desnitrificação, a redução do nitrato é caracterizada pela presença dos genes *nar* e *nap*, e a conversão de NO₂⁻ para N₂ pela presença dos genes *nir* (nitrito redutase), *nor* (óxido nítrico redutase) e *nos* (óxido nitroso redutase) (NICOL; SCHLEPER, 2006).

O nitrogênio é um dos elementos requerido em maior quantidade pelas culturas, assim, compreender o funcionamento do seu ciclo é de grande importância para otimizar os manejos agrícolas e reduzir os impactos ambientais (LI; CUPPLES, 2021). O ciclo do N, assim como o

do S, ocorre em várias diferentes etapas onde pode ser detectada a presença de genes com as mais diversas funções. Dentre os que mais se destacam estão o gene *nif*H presente em bactérias e arquéias, o gene codifica para a enzima nitrogenase responsável por quebrar a tripla ligação existente no nitrogênio atmosférico (N₂) e tem sido utilizado como alvo no estudo de micro-organismos diazotróficos (TU et al., 2017). A presença e abundância de genes funcionais estão intimamente relacionados com o ecossistema em questão e condicionados a fatores como disponibilidade de oxigênio, pH, matéria orgânica, disponibilidade de N e outros nutrientes.

Assim, identificar a população microbiana presente nos solos de TPA bem como caracterizar suas funções, permite compreender a diversidade funcional desses solos, como os micro-organismos atuam na ciclagem de nutrientes para assegurar o bom funcionamento do ecossistema e quais os impactos ambientais e científicos dessas descobertas.

4.5 CONCLUSÕES

- Existe uma ampla diversidade de micro-organismos atuando através de diferentes vias metabólicas relacionados aos ciclos biogeoquímicos nos solos de Terra Preta da Amazônia.
- ✓ O presente trabalho contribuiu para aumentar o conhecimento sobre as comunidades microbianas dos solos de Terra Preta da Amazônia e demonstrar que a abordagem metagenômica através do sequenciamento *shotgun* é uma poderosa ferramenta para conhecer a diversidade taxonômica, potencial funcional e metabólico desses solos.

4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, I.; YOKOTA, A.; FUJIWARA, T. A novel highly boron tolerant bacterium, *Bacillus boroniphilus* sp. nov., isolated from soil, that requires boron for its growth. **Extremophiles**, v. 11, p. 217-224, 2007. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00792-006-0027-0>.

ANDRADE, A. C.; FRÓES, A.; LOPES, F. A. C.; THOMPSON, F. L.; KRÜGER, R. H.; DINSDALE, E.; BRUCE, T. Diversity of microbial carbohydrate-active enZYmes (CAZYmes) associated with freshwater and soil samples from Caatinga biome. **Microbial ecology**, v. 74, p. 89-105, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00248-016-0911-9>.

ANDRÉ, I.; POTOCKI-VÉRONÈSE, G.; BARBE, S.; MOULIS, C.; REMAUD-SIÉON, M. CAZyme discovery and design for sweet dreams. **Current opinion in chemical biology**, v. 19, p. 17-24, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.11.014>.

ARKIN, A. P.; COTTINGHAM, R. W.; HENRY, C. S.; HARRIS, N. L.; STEVENS, R. L.; MASLOV, S.; DEHAL, P.; WARE, D.; PEREZ, F.; CANO, S.; SNEDDON, M. W.; HENDERSON, M. L.; RIEHJ, W. J.; MURPHY-PLSON, D.; CHAN, S. Y.; KAMIMURA, R. T.; KUMARI, S.; DRAKE, M. M.; BRETTIN, T. S.; GLASS, E. M.; CHIVIAN, D.; GUNTER, D.; WESTON, D. J.; ALLEN, B. H.; BAUMOHL, J.; BEST. A. A.; BOWEN, B.; BRENNER, S. E.; BUN, C. C.; CHANDONIA, J.; CHIA, J.; COLASANTI, R.; CONRAD, N.: DAVIS, J. J.: DAVISON, B. H.; DEJONGH, M.; DEVOID, S.; DIETRICH, E.; DUBCHAK, I.; EDIRISINGHE, J. N.; FANG, G.; FARIA, J. P.; FRYBARGER, P. M.; GERLACH, W.; GERSTEIN, M.; GREINER, A.; GURTOWSKI, J.; HAUN, H. L.; HE, F.; JAIN, R.; JOACHIMIAK, M. P.; KEEGAN, K. P.; KONDO, S.; KUMAR, V.; LAND, M. L.; MEYER, F.; MILLS, M.; NOVICHKOV, P. S.; OH, T.; OLSEN, G. J.; OLSON, R.; PARRELLO, B.; PASTERNAK, S.; PEARSON, E.; POON, S. S.; PRICE, G. A.; RAMAKRISHNAN, S.; RANJAN, P.; RONALD, P. C.; SCHATZ, M. C.; SEAVER, S. M. D.; SHUKLA, M.; SUTORMIN, R. A.; SYED, M. H.; THOMASON, J.; TINTLE, N. L.; WNAG, D.; XIA, F.; YOO, H.; YOO, S.; YU, D. KBase: the United States department of energy systems biology knowledgebase. **Nature biotechnology**, v. 36, n. 7, p. 566-569, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nbt.4163>.

ASIF, A.; MOHSIN, H.; REHMAN, Y. Chapter 9 - Purple nonsulfur bacteria: An important versatile tool in biotechnology, Editor(s): Surajit De Mandal, Ajit Kumar Passari, **Recent Advancement in Microbial Biotechnology**, Academic Press, p. 309-337, ISBN 9780128220986, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822098-6.00003-3>.

BARBOSA, J. Z.; MOTTA, A. C. V.; CORRÊA, R. S.; MELO, V. F.; MUNIZ, A. W.; MARTINS, G. C.; SILVA, L. C. R.; TEIXEIRA, W. G.; YOUNG, S. D.; BROADLEY, M. R. Elemental signatures of an Amazonian Dark Earth as result of its formation process. **Geoderma**, v. 361, p. 114085, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2019.114085>.

BONNET, M.; LAGIER, L. C.; RAOULT, D.; KHELAIFIA, S.Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. **New microbes and new infections**, v. 34, p. 100622, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100622>.

BOUGHNER, L. A.; SINGH, P. Microbial ecology: where are we now?. **Postdoc journal: a journal of postdoctoral research and postdoctoral affairs**, v. 4, n. 11, p. 3, 2016. Disponível em: <10.14304/SURYA.JPR.V4N11.2>.

BOUSSELHAM, M.; LEMRISS, S.; SHIBA, D.; AALLAM, Y.; SOUIRI, A.; ABBAS, Y.; SAÏDI, N.; BOUKCIM, H.; HAMDALI, H. *Streptomycetaceae* and *Promicromonosporaceae*: Two Actinomycetes Families from Moroccan Oat Soils Enhancing Solubilization of Natural Phosphate. **Microorganisms**, v. 10, n. 6, p. 1116, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.3390/microorganisms10061116>.

COENYE, T.; VANDAMME, P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. **Environmental microbiology**, v. 5, n. 9, p. 719-729, 2003. Disponível em: https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00471.x>.

DELGADO-GARCÍA, M.; CONTRERAS-RAMOS, S. M.; RODRÍGUES, J. A.; MATEOS-DÍAZ, J. C.; AGUILAR, C. N.; CAMACHO-RUÍZ, R. M. Isolation of halophilic bacteria associated with saline and alkaline-sodic soils by culture dependent approach. **Heliyon**, v. 4, n. 11, p. e00954, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00954>.

DELMONT, T. O.; PRESTAT, E.; KEEGAN, K. P.; FAUBLADIER, M.; ROBE, P.; CLARK, I. M.; PELLETIER, E.; HIRSCH, P. R.; MEYER, F.; GILBERT, J. A.; PASLIER, D. L.; SIMONET, P.; VOGEL, T. M. Structure, fluctuation and magnitude of a natural grassland soil metagenome. **The ISME journal**, v. 6, n. 9, p. 1677-1687, 2012. Disponível em: https://doi.org/10.1038/ismej.2011.197>.

DEVI, T. S.; VIJAY, K.; VIDHYAVATHI, R. M.; KUMAR, P.; GOVARTHANAN, M.; KAVITHA, T. Antifungal activity and molecular docking of phenol, 2, 4-bis (1, 1-dimethylethyl) produced by plant growth-promoting actinobacterium *Kutzneria* sp. strain TSII from mangrove sediments. **Archives of Microbiology**, v. 203, p. 4051-4064, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00203-021-02397-1.

FONSECA, J. P.; HOFFMANN, L.; CABRAL, B. C. A.; DIAS, V. H. G.; MIRANDA, M. R.; MARTINS, A. C. A.; BOSCHIERO, C.; BASTOS, W. R.; SILVA, R. Contrasting the microbiomes from forest rhizosphere and deeper bulk soil from an Amazon rainforest reserve. **Gene**, v. 642, p. 389-397, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.11.039>.

FOTI, M.; SOROKIN, D. Y.; LOMANS, B.; MUSSMAN, M.; ZACHAROVA, E. E.; PIMENOV, N. V.; KUENEN, J. G.; MUYZER, G. Diversity, activity, and abundance of sulfate-reducing bacteria in saline and hypersaline soda lakes. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 7, p. 2093-2100, 2007. Disponível em: https://doi.org/10.1128/AEM.02622-06>.

FRIEDRICH, C. G.; BARDISCHEWSKY, F.; ROTHER, D.; QUENTMEIER, A.; FISCHER, J. Prokaryotic sulfur oxidation. **Current opinion in microbiology**, v. 8, n. 3, p. 253-259, 2005. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.04.005>.
GEISEN, S.; BRIONES, M. J. I.; GAN, H.; BEHAN-PELLETIER, V. M.; FRIMAMN, V.; GROOT, G. A.; HANNULA, S. E.; LINDO, Z.; PHILIPPOT, L.; TIUNOV, A. V.; WALL, D. H. A methodological framework to embrace soil biodiversity. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 136, p. 107536, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.107536>.

GÓMEZ-LUNAR, Z.; HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, I.; RODRÍGUEZ-TORRES, M.; SOUZA, V.; OLMEDO-ÁLVAREZ, G. Microevolution analysis of *Bacillus coahuilensis* unveils differences in phosphorus acquisition strategies and their regulation. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 58, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00058>.

GTARI, M.; GHODHBANE-GTARI, F.; NOUIOUI, I.; BEAUCHEMIN, N.; TISA, L.S. Phylogenetic perspectives of nitrogen-fixing actinobacteria. **Archives of microbiology**, v. 194, p. 3-11, 2012. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00203-011-0733-6>.

GYANESHWAR, P.; HIRSCH, A. M.; MOULIN, L.; CHEN, W.; ELLIOTT, G. N.; BONTEMPS, C.; SANTOS, P. E.; GROSS, E.; REIS, F. B.; SPRENT, J. I.; YOUNG, P. W.; JAMES, E. K. Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 24, n. 11, p. 1276-1288, 2011. Disponível em: https://doi.org/10.1094/MPMI-06-11-0172>.

HARIHARAN, J.; SENGUPTA, A.; GREWAL, P.; DICK, W. Functional predictions of microbial communities in soil as affected by long-term tillage practices. Agricultural & Environmental Letters, v. 2, n. 1, p. 170031, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.2134/ael2017.09.003>.

HORI, T.; MÜLLER, A.; IGARASHI, Y.; CONRAD, R.; FRIEDRICH, M. W. Identification of iron-reducing microorganisms in anoxic rice paddy soil by ¹³C-acetate probing. **The ISME journal**, v. 4, n. 2, p. 267-278, 2010. Disponível em: https://doi.org/10.1038/ismej.2009.100>.

HUANG, L.; ZHANG, H.; WU, P.; ENTWISTLE, S.; LI, X.; YOHE, T.; YI, H.; YANG, Z.; YIN, Y. dbCAN-seq: a database of carbohydrate-active enzyme (CAZyme) sequence and annotation. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D516-D521, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1093/nar/gkx894>.

HUGON, P.; DUFOUR, J.; COLSON, P.; FOURNIER, P.; SALLAH, K.; RAOULT, D. A comprehensive repertoire of prokaryotic species identified in human beings. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 10, p. 1211-1219, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00293-5>.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of Azospirillum brasilense and A. lipoferum improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and soil**, v. 331, p. 413-425, 2010. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s11104-009-0262-0>.

JANSSEN, P. H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 3, p. 1719-1728, 2006. Disponível em: https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1719-1728.2006>.

KERN, D. C. LIMA, H. P.; COSTA, J. A.; LIMA, H. V.; RIBEIRO, A. B.; MORAES, B. M.; KÄMPF, N. Terras pretas: Approaches to formation processes in a new paradigm. **Geoarchaeology**, v. 32, n. 6, p. 694-706, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1002/gea.21647>.

KNIEF, C. Diversity and habitat preferences of cultivated and uncultivated aerobic methanotrophic bacteria evaluated based on *pmo*A as molecular marker. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1346, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01346>.

LAGOS, L.; MARUYAMA, F.; NANNIPIERI, P.; MORA, M. L.; OGRAM, A.; JORQUERA, M. A. Current overview on the study of bacteria in the rhizosphere by modern molecular techniques: a mini–review. **Journal of soil science and plant nutrition**, v. 15, n. 2, p. 504-523, 2015. Disponível em: http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162015005000042>.

LI, T.; ZHOU, Q. The key role of *Geobacter* in regulating emissions and biogeochemical cycling of soil-derived greenhouse gases. **Environmental Pollution**, v. 266, p. 115135, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115135.

LI, Z.; CUPPLES, A. M. Diversity of nitrogen cycling genes at a Midwest long-term ecological research site with different management practices. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 10, p. 4309-4327, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00253-021-11303-0>.

LIMA, A. B.; CANNAVAN, F. S.; NAVARRETE, A. A.; TEIXEIRA, W. G.; KURAMAE, E. E.; TSAI, S. M. Amazonian Dark Earth and plant species from the Amazon region contribute to shape rhizosphere bacterial communities. **Microbial ecology**, v. 69, p. 855-866, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00248-014-0472-8>.

LIU, B.; DONG, X. *Lactobacillus pantheris* sp. nov., isolated from faeces of a jaguar. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1745-1748, 2002. Disponível em: https://doi.org/10.1099/00207713-52-5-1745.

LIU, T.; PENG, H.; WOLLNEY, S.; SHEN, C. Rhizosphere Microbiome Regulates the Growth of Mustard under Organic Greenhouse Cultivation. **Agriculture**, v. 11, n. 10, p. 987, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.3390/agriculture11100987>.

McALLISTER, T. A.; DUNIÈRE, L.; DROUIN, P.; XU, S.; WANG, Y.; MUNNS, K.; ZAHEER, R. Silage review: Using molecular approaches to define the microbial ecology of silage. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, p. 4060-4074, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.3168/jds.2017-13704>.

NAVARRETE, A. A.; CANNAVAN, F. S.; TAKETANI, R. G.; TSAI, S. M. A molecular survey of the diversity of microbial communities in different ornala agricultural model systems. **Diversity**, v. 2, p. 787-809, 2010. Disponível em: https://doi.org/10.3390/d2050787>.

NAVARRETE, A. A.; KURAMAE, E. E.; HOLLANDER, M.; PIJL, A. S.; van VEEN, J. A.; TSAI, S. M. Acidobacterial community responses to agricultural management of soybean in Amazon forest soils. **FEMS microbiology ecology**, v. 83, n. 3, p. 607-621, 2013. Disponível em: https://doi.org/10.1111/1574-6941.12018>.

NICOL, G. W.; SCHLEPER, C. Ammonia-oxidising Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle?. **TRENDS in Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 207-212, 2006. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.03.004>.

NOWKA, B. OFF, S.; DAIMS, H.; SPIECK, E. Improved isolation strategies allowed the phenotypic differentiation of two *Nitrospira* strains from widespread phylogenetic lineages. **FEMS microbiology ecology**, v. 91, n. 3, p. fiu031, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1093/femsec/fiu031>.

PAGANO, M. C.; RIBEIRO-SOARES, J.; CANÇADO, L. G; FALCÃO, N. P. S.; GONÇALVES, V. N.; ROSA, L. H.; TAKAHASHI, J. A.; ACHETE, C. A.; JORIO, A. Depth dependence of black carbon structure, elemental and microbiological composition in anthropic Amazonian dark soil. **Soil and Tillage Research**, v. 155, p. 298-307, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.still.2015.09.001>.

RAWAT, S. R.; MÄNNISTÖ, M. K.; BROMBERG, Y.; HÄGGBLOM, M. M. Comparative genomic and physiological analysis provides insights into the role of *Acidobacteria* in organic carbon utilization in Arctic tundra soils. **FEMS microbiology ecology**, v. 82, n. 2, p. 341-355, 2012. Disponível em: ">https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01381.x>.

ROBINSON, M.; JAIMES-BETANCOURT, C.; ELLIOTT, S.; MAEZUMI, S. Y.; HILBER, L.; ALVES, D.; SOUZA, J. G.; IRIARTE, J. Anthropogenic soil and settlement organisation in the Bolivian Amazon. **Geoarchaeology**, v. 36, n. 3, p. 388-403, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1002/gea.21839>.

RODPAI, R.; SANPOOL, O.; THANCHOMNANG, T.; WANGWIWATSIN, A.; SADAOW, L.; PHUPIEWKHAM, W.; BOONROUMKAEW, P.; INTAPAN, P. M.; MALEEWONG, W. Investigating the microbiota of fermented fish products (*Pla-ra*) from different communities of northeastern Thailand. **Plos one**, v. 16, n. 1, p. e0245227, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245227>.

ROESCH, L. F. W.; FULTHORPE, R. R.; RIVA, A.; CASELLA, G.; HADWIN, A. K. M.; KENT, A. D.; DAROUB, S. H.; CAMARGO, F. A. O.; FARMERIE, W. G.; TRIPLETT, E. W. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **The ISME journal**, v. 1, n. 4, p. 283-290, 2007. Disponível em: https://doi.org/10.1038/ismej.2007.53>.

ROTHER, D.; ORAWSKI, G.; BARDISCHEWSKY, F.; FRIEDRICH, C. G. SoxRSmediated regulation of chemotrophic sulfur oxidation in *Paracoccus pantotrophus*. **Microbiology**, v. 151, n. 5, p. 1707-1716, 2005. Disponível em: https://doi.org/10.1099/mic.0.27724-0>.

SAIT, M.; HUGENHOLTZ, P.; JANSSEN, P. H. Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. **Environmental microbiology**, v. 4, n. 11, p. 654-666, 2002. Disponível em: ">https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00352.x>">https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00352.x>.

SANTOS, P. E.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2790-2798, 2001. Disponível em: https://doi.org/10.1128/AEM.67.6.2790-2798.2001>.

SELMA, M. V.; BELTRÁN, D.; LUNA, M. C.; ROMO-VAQUERO, M.; GARCÍA-VILLALBA, R.; MIRA, A.; ESPÍN, J. C.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Isolation of human intestinal bacteria capable of producing the bioactive metabolite isourolithin a from ellagic acid. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1521, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01521>.

SENGUPTA, A.; DICK, W. A. Methanotrophic bacterial diversity in two diverse soils under varying land-use practices as determined by high-throughput sequencing of the *pmoA* gene. **Applied soil ecology**, v. 119, p. 35-45, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.05.031>.

SHAFFER, M.; BORTON, M. A.; McGIVERN, B. B.; ZAYED, A. A.; ROSA, S. L. L.; SOLDEN, L. M.; LIU, P.; NARROWE, A. B.; RODRÍGUEZ-RAMOS, J.; BOLDUC, B.; GAZITÚA, M. C.; DALY, R. A.; SMITH, G. J.; VIK, D. R.; POPE, P. B.; SULLIVAN, M. B.; ROUX, S.; WRIGHTON, K. C. DRAM for distilling microbial metabolism to automate the curation of microbiome function. **Nucleic acids research**, v. 48, n. 16, p. 8883-8900, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1093/nar/gkaa62>.

SHARPTON, T. J. An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 209, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00209>.

SIMONIN, M.; RICHAUME, A. Impact of engineered nanoparticles on the activity, abundance, and diversity of soil microbial communities: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 13710-13723, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s11356-015-4171-x.

SOUZA, R. C.; CANTÃO, M. E.; VASCONCELOS, A. T. R.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Soil metagenomics reveals differences under conventional and no-tillage with crop rotation or succession. **Applied Soil Ecology**, v. 72, p. 49-61, 2013. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.05.021>.

STIEGLMEIER, M.; KLINGL, A.; ALVES, R. J. E.; RITTMANN, S. K. R.; MELCHER, M.; LEISCH, N.; SCHLEPER, C. *Nitrososphaera viennensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic and mesophilic, ammonia-oxidizing archaeon from soil and a member of the archaeal phylum *Thaumarchaeota*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. Pt 8, p. 2738, 2014. Disponível em: <10.1099/ijs.0.063172-0>.

TAKETANI, R. G.; LIMA, A. B.; JESUS, E. C.; TEIXEIRA, W. G.; TIEDJE, J. M.; TSAI, S. M. Bacterial community composition of anthropogenic biochar and Amazonian anthrosols assessed by 16S Rrna gene 454 pyrosequencing. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 104, n. 2, p. 233-242, 2013. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s10482-013-9942-0>.

TEIXEIRA, L. R.; FERNANDES, T. M.; SILVA, M. A.; MORGADO, L.; SALGUEIRO, C. A. Characterization of a Novel Cytochrome Involved in *Geobacter sulfurreducens*' Electron Harvesting Pathways. **Chemistry–A European Journal**, v. 28, n. 66, p. e202202333, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.1002/chem.202202333.

TRABELSI, D.; MHAMDI, R. Microbial inoculants and their impact on soil microbial communities: a review. **BioMed research international**, v. 2013, 2013. Disponível em: https://doi.org/10.1155/2013/863240>.

TU, Q.; HE, Z.; WU, L.; XUE, K.; XIE, G.; CHAIN, P.; REICH, P. B.; HOBBIE, S. E.; ZHOU, J. Metagenomic reconstruction of nitrogen cycling pathways in a CO2-enriched grassland ecosystem. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 106, p. 99-108, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.12.017>.

VANWONTERGHEM, I.; JENSESN, P. D.; HO, D. P.; BATSTONE, D. J.; TYSON, G. W. Linking microbial community structure, interactions and function in anaerobic digesters using new molecular techniques. **Current opinion in biotechnology**, v. 27, p. 55-64, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.11.004>.

VENTURINI, A. M.; DIAS, N. M.S.; GONTIJO, J. B.; YOSHIURA, C. A.; PAULA, F. S.; MEYER, K. M.; NAKAMURA, F. M.; FRANÇA, A. G.; BORGES, C. D.; BARLOW, J.; BERENGUER, E.; NÜSSLEIN, K.; RODRIGUES, J. L. M.; BOHANNAN, B. J. M.; TSAI, S. M. Increased soil moisture intensifies the impacts of forest-to-pasture conversion on methane emissions and methane-cycling communities in the Eastern Amazon. Environmental research, v. 212, p. 113139, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113139>.

VENTURINI, A. M.; GONTIJO, J. B.; MANDRO, J. A.; PAULA, F. S.; YOSHIURA, C. A.; FRANÇA, A. G.; TSAI, S. M. Genome-resolved metagenomics reveals novel archaeal and bacterial genomes from Amazonian forest and pasture soils. **Microbial Genomics**, v. 8, n. 7, p. 000853, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.1099/mgen.0.000853>.

YIN, C.; JONES, K. L.; PEERSON, D. E.; GARRETT, K. A.; HULBERT, S. H.; PAULITZ, T. C. Members of soil bacterial communities sensitive to tillage and crop rotation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 12, p. 2111-2118, 2010. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.08.006>.

YOO, K.; LEE, T. K.; CHOI, E. J.; YANG, J.; SHUKLA, S. K.; HWANG, S.; PARK, J. Molecular approaches for the detection and monitoring of microbial communities in bioaerosols: A review. **Journal of Environmental Sciences**, v. 51, p. 234-247, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.07.002>.

YU, X.; ZHOU, J.; SONG, W.; XU, M.; HE, Q.; PENG, Y.; TIAN, Y.; WANG, C.; SHU, L.; WANG, S.; YAN, Q.; LIU, J.; TU, Q.; HE, Z. SCycDB: a curated functional gene database for metagenomic profiling of sulphur cycling pathways. **Molecular Ecology Resources**, v. 21, n. 3, p. 924-940, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1111/1755-0998.13306>.

ZIVIANI, M. M.; REIS, I. M. S.; TAVARES, O. C. H.; SILVA, E. R. O.; SANTOS, O. A. Q.; PINTO, L. A. S. R.; PEREIRA, M. G. Organic Matter in Soils with Anthropic Horizons in The Eastern Amazon, Pará (Brazil). **Floresta e Ambiente**, v. 29, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.1590/2179-8087-FLORAM-2021-0091.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os isolados obtidos da Terra Preta da Amazônia apresentaram resultados promissores quando testados "in vitro" para os mecanismos de promoção de crescimento de plantas, tais como: solubilização de fosfato de cálcio, produção de AIA e sideróforos, e fixação biológica de nitrogênio. Para confirmar a eficiência dessas bactérias são recomendados testes em casa de vegetação para fins de autenticação, seguidos de experimentos em condições de campo e assim obter dados complementares para a recomendação e formulação de um bioproduto para aplicações futuras na agricultura. Quanto à análise metagenômica, a presença de muitos bins sem agrupamento com vizinhos conhecidos nos solos de Terra Preta pode indicar organismos que ainda não tiveram seu genoma mapeado confirmando o fato de que existe maior diversidade taxonômica do que no solo adjacente. Já a identificação de representantes do ciclo do carbono, nitrogênio, enxofre e metano confirmam a importância ecológica e biotecnológica dos microorganismos presentes no solo de Terra Preta, reafirmando a diversidade microbiana e funcional ainda pouco conhecida e a importância desses micro-organismos na manutenção da fertilidade do solo desempenhando seus respectivos papéis na ciclagem de nutrientes. Embora seja uma análise complexa devido à quantidade de matéria orgânica presente no solo, a utilização da metaproteômica como ferramenta complementar de estudo nos solos de Terra Preta é uma excelente alternativa para estudos futuros a fim de entender o metabolismo dos microorganismos bem como suas vias metabólicas.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Meio de cultura King B (KING; WARD; RANEY, 1954)

Peptona bacteriológica 20g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O 1,5g/L
K ₂ HPO ₄ 1,5g/L
Ágar 15g/L
Glicerina 10 mL/L
рН 7,2

APÊNDICE B – Meio de cultura sólido para avaliar solubilização de fosfato de cálcio bibásico (VERMA; LADHA; TRIPATHI, 2001)

Glucose	10g/L;
NH ₄ Cl	5g/L
NaCl	1g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	1g/L
CaHPO ₄	4 g/L
Ágar	15g/L
рН 7,2	

APÊNDICE C – Meio de cultura Tryptone Soya Broth (TSB)

Peptona de caseína17g/L	
Peptona de soja3,0 g/L	
Glicose2,5g/L	
NaCl5,0g/L	
K ₂ HPO ₄ 2,5g/L	
рН 7,3	
APÊNDICE D – Meio de cultura King B (KIN	G; WARD; RANEY, 1954)
Peptona bacteriológica 20g/L	
MgSO4.7H2O 1,5g/L	,
K2HPO41,5g/L	
Glicerina 10 mL	/L

pH 7,2

APÊNDICE E – Solução cromo azurol S – CAS

Solução A

Cromo azurol S	- 12,2 mg
Água deionizada	10,0 mL

Solução B

HCl	84,0 μ1
Água deionizada	100 mL
FeCl ₃ .6H ₂ O	27,0 mg

Solução C

HDTMA	21,9 mg
Água deionizada	25,0 mL

Solução D

Piperazina anidra	4,307 g
Água deionizada	40,0 mL
pH da solução final 5,6	

APÊNDICE F - Meio de cultura JNFB semi-sólido (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI,

1995)	
Ácido málico	5 g/L
K ₂ HPO ₄	0,6 g/L
KH2PO4	1,8 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	- 0,2 g/L
NaCl	0,1 g/L
CaCl.2H ₂ O	- 0,02 g/L
Fe EDTA (1,64%)	- 4 mL
КОН	4,5 g/L
Solução de micronutrientes	- 1 mL
Solução de vitaminas	- 1 mL
Azul de bromotimol	2 mL
Ágar	- 2,350 g/L
pH 6,8	



APÊNDICE G - Dendrograma de similaridade entre os 149 isolados obtidos no horizonte A



$\mathbf{AP}\mathbf{\hat{E}NDICE}\ \mathbf{H}$ - Dendrograma de similaridade entre os 194 isolados obtidos no horizonte B



APÊNDICE I - Dendrograma de similaridade entre os 123 isolados obtidos no horizonte C



APÊNDICE J - Percentagem de isolados por características morfofisiológicas avaliadas no perfil de Terra Preta da Amazônia