



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

FELIPE COSTA TRINDADE

**METAPROTEÔMICA COMPARATIVA DE SOLOS DE CAMPOS RUPESTRES
FERRUGINOSOS E DE ÁREAS MINERADAS EM RECUPERAÇÃO**

BELÉM

2019

FELIPE COSTA TRINDADE

**METAPROTEÔMICA COMPARATIVA DE SOLOS DE CAMPOS RUPESTRES
FERRUGINOSOS E DE ÁREAS MINERADAS EM RECUPERAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

BELÉM

2019

FELIPE COSTA TRINDADE

**METAPROTEÔMICA COMPARATIVA DE SOLOS DE CAMPOS RUPESTRES
FERRUGINOSOS E DE ÁREAS MINERADAS EM RECUPERAÇÃO**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à
Agropecuária, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

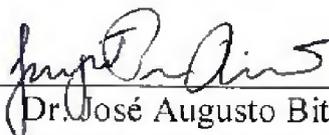
Orientador: Dr. Rafael Borges da Silva Valadares

BANCA EXAMINADORA



Dr. Rafael Borges da Silva Valadares – Presidente

INSTITUTO TECNOLÓGICO VALE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL



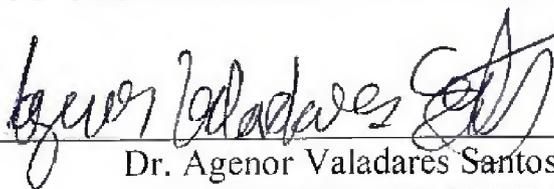
Dr. José Augusto Bitencourt – 1º Examinador

INSTITUTO TECNOLÓGICO VALE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL



Dr. Markus Gastauer – 2º Examinador

INSTITUTO TECNOLÓGICO VALE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL



Dr. Agenor Valadares Santos – 3º Examinador

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

BELÉM

2019

RESUMO GERAL

Apesar dos benefícios econômicos e sociais a mineração tem forte impacto em ecossistemas terrestres, promovendo a degradação do solo onde esta atividade é implantada. As regiões da Serra dos Carajás – PA e de Nova Lima – MG possuem particularidades como espécies microbianas e vegetais adaptadas as condições adversas, onde solos lateríticos ferruginosos (canga) e solos associados a arenitos ocorrem. A reabilitação de áreas mineradas é condição obrigatória para que esta atividade continue a ocorrer de maneira sustentável. A metaproteômica de solos é uma técnica que identifica proteínas acumuladas por organismos no ambiente. Assim, a caracterização do perfil de proteínas foi realizada para mapear, quantificar e comparar as funções bioquímicas mais abundantes em solos nativos e em áreas em diferentes estágios de recuperação. A partir de solos coletados nestas condições, as proteínas foram extraídas, tratadas e analisadas em cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa de alta resolução. Primeiramente, foram identificadas 356 proteínas em uma amostra de solo de floresta e 147 proteínas em um solo de canga. Nestes solos, mais categorias funcionais estavam associadas ao solo de canga, 66 contra 42 no de floresta. Observou-se também maior diversidade de táxons na floresta e na canga espécies capazes de tolerar a sua condição ambiental rigorosa. Assim, a metaproteômica evidenciou respostas moleculares de microrganismos e vegetais a um ambiente mais severo e a outro mais rico em nutrientes e matéria orgânica. Em um segundo experimento, a metaproteômica foi aplicada em uma cronossequência de áreas em recuperação (solo exposto, 4, 12, 14 anos de recuperação e áreas nativas). Os resultados apontaram para maior quantidade de proteínas identificadas nos solos com 4 anos de recuperação (336), 12 anos (329), 14 anos (219) e Solos Nativos (291) se comparados ao Solo Exposto (40). Embora o solo com dois anos de recuperação tenha maior quantidade de proteínas, ao se verificar a abundância de grupos bacterianos, a categorização funcional em processos biológicos, maiores similaridades são encontradas entre as áreas de recuperação avançada e solo nativo; demonstrando o sucesso de reabilitação, ao menos do ponto de vista bioquímico do solo. Através da metaproteômica conseguimos obter respostas metabólicas específicas dos organismos do solo de acordo com o status de reabilitação da área. Sobretudo a metaproteômica foi capaz de caracterizar funções bioquímicas do solo e discriminar tanto áreas nativas quanto áreas de recuperação, se mostrando uma ferramenta poderosa para o monitoramento ambiental de áreas de interesse.

Palavras-chave: recuperação de áreas degradadas; bioquímica do solo; espectrometria de massas; monitoramento ambiental; microbiologia do solo

ABSTRACT

Despite the economic and social benefits, mining has a strong impact on terrestrial ecosystems, promoting the degradation of soil where this activity is implemented. The regions of Serra dos Carajás - PA and Nova Lima - MG have particularities such as microbial and plant species adapted to the adverse conditions, where ferruginous lateritic soils (canga) and soils associated to sandstones occur. The rehabilitation of mined areas is a mandatory condition for this activity continue to occur in a sustainable manner. Soil metaproteomics is a technique that identifies proteins accumulated by organisms in the environment. Thus, characterization of the protein profile was performed to map, quantify and compare the most abundant biochemical functions in native soils and in areas at different stages of reclamation. From soils collected under these conditions, proteins were extracted, treated and analyzed in liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. First, 356 proteins were identified in a sample of forest soil and 147 proteins in a canga soil. In these soils, more functional categories were associated with canga soil, 66 versus 42 in the forest. It was also observed a greater diversity of taxa in the forest, and in the canga species able to tolerate their rigorous environmental condition. Thus, the metaproteomics evidenced molecular responses of microorganisms and plants to a more severe environment and to another richer in nutrients and organic matter. In a second experiment, the metaproteomics was applied in a chronosequence of areas under reclamation (exposed soil, 4, 12, 14 years of reclamation and native areas). The results pointed to the highest amount of proteins identified in the soils with four years of reclamation (336), 12 years (329), 14 years (219) and Native Soils (291), when compared with Expose Soil (40). Although the initial reclamation soil (4 years) has a higher amount of protein, when the abundance of bacterial groups and the functional categorization of proteins are verified, greater similarities are found between advanced reclamation areas and native soils; demonstrating the success of rehabilitation, at least from the soil biochemical point of view. Through metaproteomics we can obtain specific metabolic responses from soil organisms according to the rehabilitation status of the area. Above all, metaproteomics was able to characterize soil biochemical functions and to discriminate both native and reclamation areas, proving to be a powerful tool for the environmental monitoring of areas of interest.

Keywords: reclamation of degraded areas; soil biochemistry; mass spectrometry; environmental monitoring; soil microbiology

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D-LC-MS^c – Cromatografia líquida bi-dimensional acoplada a espectrometria de massas de alta resolução

EC – Enzyme Commission number

FLONA – Floresta Nacional de Carajás

GO – Gene Ontology

IAF – Índice de Área Foliar

LCA – Lowest Common Ancestor (menor ancestral comum)

MOS – Matéria Orgânica do Solo

PCA – Principal Component Analysis ou Análise de Componentes Principais

PRAD – Projeto de Recuperação de Áreas Degradadas

RA12 – Recuperação Avançada com 12 anos de revegetação

RA14 – Recuperação Avançada com 14 anos de revegetação

RAD – Recuperação de Áreas Degradadas

RI – Recuperação Inicial com 4 anos de revegetação

SC – Solo de canga arbustiva

SE – Solo Exposto

SF – Solo de floresta secundária pertencente à Mata Atlântica

SN – Solo Nativo de referência

SVD – Singular Value Decomposition ou Decomposição em Valores Singulares

UPGMA – Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages ou método de associação média

SUMÁRIO

RESUMO GERAL

ABSTRACT

1. CONTEXTUALIZAÇÃO.....	8
2. METAPROTEÔMICA DE SOLOS ASSOCIADOS À CROSTA SUPERFICIAL DE FERRO NO SUDESTE BRASILEIRO.....	13

RESUMO

2.1 Introdução.....	14
2.2 Material e Métodos.....	15
2.3 Resultados e discussão.....	18
2.4 Conclusão.....	25
2.5 Referências.....	26

3. METAPROTEÔMICA COMPARATIVA DE SOLOS DE ÁREAS MINERADAS EM RECUPERAÇÃO NO NORTE BRASILEIRO.....	30
--	-----------

RESUMO

3.1 Introdução.....	31
3.2 Material e métodos.....	32
3.3 Resultados e discussão.....	36
3.4 Conclusão.....	48
3.5 Referências.....	49

APÊNDICES.....	56
-----------------------	-----------

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

A mineração pode alterar drasticamente a paisagem, tendo em vista a completa supressão da vegetação, remoção das camadas de topsoil e eventuais contaminações do solo por resíduos tóxicos (LOSFELD et al., 2015). Leis ambientais no Brasil requerem medidas de compensação para impactos na biodiversidade e nos recursos naturais, diante disso decorre a necessidade de elaboração de um Projeto de Recuperação de Áreas Degradadas (PRAD), um documento que descreve em detalhes todas as atividades de reabilitação planejadas e realizadas. O descumprimento dessas medidas de compensação resulta na retirada da licença de operação (GASTAUER et al., 2018a).

Decorrido um impacto ambiental, a legislação brasileira permite tanto a restauração quanto a reabilitação como sistema de RAD a ser executado (GASTAUER et al., 2018a). Neste sentido, no presente trabalho a estratégia utilizada para a recuperação de áreas mineradas tem sido a reabilitação. No Brasil, o ecossistema reabilitado pode ser diferente do ocupado na área antes do impacto, porém formações similares às originais podem ser encontradas dentro da região ou bacia hidrográfica (GASTAUER et al., 2018a).

A restituição da biodiversidade bem como da estrutura do ecossistema, funcionamento e serviços é necessária para compensar perdas de recursos bióticos (GASTAUER et al., 2018b). Assim, a revegetação inicia incorporação de C em áreas degradadas e garante a acumulação da liteira e sua decomposição como uma primeira etapa, ambos são condições prévias para a estabilização da biodiversidade e para processos como ciclagem de nutrientes, sequestro de carbono e funcionamento geral do ecossistema a longo prazo (GASTAUER et al., 2018b).

Ainda a respeito dos fundamentos e objetivos da RAD, é sabido que ecossistemas mais diversos propiciam maior produção de biomassa, bem como maior resiliência e resistência a perturbações. Ademais, são selecionadas para projetos de RAD algumas espécies de leguminosas pela reconhecida capacidade de fixar nitrogênio atmosférico e transferi-lo a outras plantas. Em suma, o sucesso da reabilitação ambiental de uma área degradada pode ser avaliado pela comparação entre diferentes estágios de reabilitação com referências de áreas nativas (GASTAUER et al., 2018a; VICKERS; GILLESPIE; GRAVINA, 2012).

Nesse contexto, estão presentes nos estados de Minas Gerais e Pará ecossistemas sob uma crosta superficial de ferro (canga), os quais apresentam uma biodiversidade singular, que evoluiu para adaptar-se à condição ambiental rigorosa (SCHAEFER et al.; 2015; SKIRYCZ et al., 2014). Esta biodiversidade está assentada sob minérios economicamente valiosos, fazendo necessário estudos que identifiquem processos biológicos executados pela

comunidade microbiana e vegetal de áreas nativas, que poderão ser úteis como dados referência para eventuais estudos de RAD em locais de mineração. Sendo assim, o capítulo 1 desta dissertação relata a metaproteômica realizada em solo de canga, em áreas nativas tanto de floresta quanto de vegetação arbustiva.

A metaproteômica é uma técnica capaz de examinar processos biológicos que ocorrem em um ambiente, através da observação de proteínas expressas pelos organismos dentro de um ecossistema em um momento específico (KEIBLINGER et al., 2012). Ela pode ser utilizada para desvendar a atividade microbiana, vias metabólicas, a transdução de sinais envolvida na comunidade biótica do solo e para identificar organismos presentes em diferentes ecossistemas (ZAMPIERI et al., 2016).

A metaproteômica serve como uma poderosa ferramenta capaz de elucidar diversos processos metabólicos ativos, como as interações entre culturas e microrganismos no solo, na rizosfera, os mecanismos relacionados à produção de energia, à biossíntese e *turnover* de proteínas, à maquinaria de defesa e ao metabolismo secundário (MATTAROZZI et al., 2017; SCHNEIDER et al., 2012). Ademais, esta técnica pode descrever rotas celulares que são ativadas para responder a uma perturbação no solo, e apontar também como respostas celulares específicas tornam populações microbianas mais resilientes (BASTIDA; JEHLICH, 2016).

Trabalhos recentes têm avaliado através da metaproteômica a dinâmica de transformações dos elementos a partir da ação enzimática microbiana, a qual é central nos processos de solubilização, quelação e oxidação/redução dos nutrientes no solo (BASTIDA; HERNÁNDEZ; GARCÍA, 2014; BISWAS; SARKAR, 2018; YAO et al., 2018). Desse modo, enzimas chave (*e.g.* desidrogenases envolvidas na oxidação da matéria orgânica, nitrogenases, fosfatases e arilsulfatases) podem ser encontradas no proteoma de determinados microrganismos, possibilitando apontar as transformações bioquímicas que estão ocorrendo no solo (BISWAS; SARKAR, 2018).

Informações a respeito do metabolismo microbiano do solo, juntamente com suas relações com a comunidade vegetal no ecossistema, são de fundamental importância para se buscar a sustentabilidade no uso do solo (BASTIDA; HERNÁNDEZ; GARCÍA, 2014; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2013; WANG et al., 2016). Nesse sentido, são apresentadas como exemplo algumas das enzimas que executam transformações bioquímicas mediadas por microrganismos e plantas dentro dos ciclos biogeoquímicos do carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre (Tabela 1), dos quais os elementos são nutrientes essenciais a plantas e requeridos por microrganismos.

Tabela 1. Exemplos de enzimas participantes da ciclagem de C, N, P e S.

Nutriente	Enzima	Número EC
Ciclagem de Carbono	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	1.2.1.12
	Lactato desidrogenase	1.1.1.27
	Malato desidrogenase	1.1.1.37
	Catecol 2,3-dioxigenase	1.13.11.2
	α -l-arabinofuranosidase	3.2.1.55
Ciclagem de Nitrogênio	Ferredoxina nitrito redutase	1.7.7.1
	Amônia monoxigenase	1.14.99.39
	Nitrogenase	1.18.6.1
	Nitrato redutase	1.7.1.3
	Nitrila hidratase	4.2.1.84
Ciclagem de Fósforo	3-fitase	3.1.3.8
	Fosfolipase A1	3.1.1.32
	Fosfolipase A2	3.1.1.4
	Fosfodiesterase	3.1.4.1
	Esfingomielina fosfodiesterase	3.1.4.12
Ciclagem de Enxofre	Sulfito redutase assimilativa	1.8.1.2
	Arilsulfatase	3.1.6.1
	Cisteína dessulfidrase	2.8.1.7
	APS redutase	1.8.99.2
	Taurina dioxigenase	1.14.11.17

Fonte: o autor, 2018. Baseado em Bastida, Hernández e García. (2014), Williams et al. (2012), e Yao et al. (2018).

Ao planejar e executar um projeto de RAD deve-se levar em consideração a complexidade de processos ecológicos que ocorre durante a reabilitação de uma área, já que incertezas sobre a seleção de espécies, o manejo, o controle de espécies invasoras e os procedimentos de monitoramento são desafios encontrados em projetos de reabilitação (GASTAUER et al., 2018b). Sendo assim, procedimentos de monitoramento em áreas de RAD requerem uma pesquisa multidisciplinar.

Apresentada no Capítulo 2 desta dissertação, a metaproteômica realizada em áreas de RAD e em áreas nativas dentro da Floresta Nacional (FLONA) de Carajás teve como objetivo

avaliar as diferenças funcionais de organismos do solo, entre áreas de RAD com distintos estágios de recuperação, utilizando áreas nativas de floresta como referência.

Este estudo tem como hipóteses (i) que a metaproteômica permite acessar o status metabólico de populações microbianas e vegetais em diferentes fitofisionomias, (ii) que é uma técnica capaz de gerar indicadores moleculares de restauração ambiental e (iii) que áreas em estágios mais avançados de recuperação se assemelham a áreas nativas de referência. Assim, o objetivo deste trabalho é apresentar a metaproteômica como ferramenta útil para o monitoramento profundo de solos de áreas em recuperação.

REFERÊNCIAS

- BASTIDA, F.; JEHLICH, N. It's all about functionality: How can metaproteomics help us to discuss the attributes of ecological relevance in soil? **Journal of Proteomics**, v. 144, p. 159–161, 2016. doi: 10.1016/j.jprot.2016.06.002
- BASTIDA, F.; HERNÁNDEZ, T., GARCÍA, C. Metaproteomics of soils from semiarid environment: Functional and phylogenetic information obtained with different protein extraction methods. **Journal of Proteomics**. v. 101, p. 31 – 42, 2014. doi: 10.1016/j.jprot.2014.02.006
- BISWAS R., SARKAR A. ‘Omics’ Tools in Soil Microbiology: The State of the Art. In: Adhya T., Lal B., Mohapatra B., Paul D., Das S. (eds) **Advances in Soil Microbiology: Recent Trends and Future Prospects**. Microorganisms for Sustainability, vol 3. Springer, Singapore. 2018. doi: 10.1007/978-981-10-6178-3
- GASTAUER, M.; SOUZA FILHO, P. W. M.; RAMOS, S. J.; CALDEIRA, C. F.; SILVA, J. R.; SIQUEIRA, J. O.; FURTINI NETO, A. E. Mine land rehabilitation in Brazil: Goals and techniques in the context of legal requirements. **Ambio**, v. 48, p. 47-88, 2018a. doi: 10.1007/s13280-018-1053-8
- GASTAUER, M.; SILVA, J. R.; CALDEIRA JUNIOR, C. F.; RAMOS, S. J.; SOUZA FILHO, P. W. M.; FURTINI NETO, A. E.; SIQUEIRA, J. O. Mine land rehabilitation: Modern ecological approaches for more sustainable mining. **Journal of Cleaner Production**, v. 172, p. 1409–1422, 2018b.
- GRIFFITHS, B. S.; PHILIPPOT, L. Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 2, p. 112–129, 2013. doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00343
- KEIBLINGER, K. M.; WILHARTITZ, I. C.; SCHNEIDER, T.; ROSCHITZKI, B.; SCHMID, E.; EBERL, L.; RIEDEL, K.; ZECHMEISTER-BOLTENSTERN, S. Soil metaproteomics - Comparative evaluation of protein extraction protocols. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 54, p. 14–24, 2012. doi:10.1016/j.soilbio.2012.05.014
- LOSFELD, G.; L'HUILLIER, L.; FOGLIANI, B.; JAFFRÉ, T.; GRISON, C. Mining in New Caledonia: environmental stakes and restoration opportunities. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 8, p. 5592–5607, 2015. doi: 10.1007/s11356-014-3358-x

MATTAROZZI, M.; MANFREDI, M.; MONTANINI, B.; GOSETTI, F.; SANANGELANTONI, A., M.; MARENGO, E.; CARERI, M.; VISIOLI, G. A metaproteomic approach dissecting major bacterial functions in the rhizosphere of plants living in serpentine soil. **Anal Bioanal Chem.** v. 409, p. 2327-2339, 2017. doi: 10.1007/s00216-016-0175-8

NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Indicadores microbiológicos da qualidade do solo. **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo.** 3º Reunião paranaense de ciência do solo. 2013. <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/958093/1/Indicadoresmicrobiologicosdaqualidadedosolo.pdf>

SCHAEFER, C. E.; CÂNDIDO, H. G.; CORRÊA, G. R.; PEREIRA, A.; NUNES, J. A.; SOUZA, O. F.; MARINS, A.; FILHO, E. F.; KER, J. C. Solos desenvolvidos sobre canga ferruginosa no Brasil: uma revisão crítica e papel ecológico de termiteiros. In: CARMO, F. F. & KAMINO L. H. Y. *Geossistemas Ferruginosos do Brasil: Áreas Prioritárias para a Conservação da Diversidade Geológica e Biológica, Patrimônio Cultural e Serviços Ambientais.* Belo Horizonte: 3i editora, 2015. p. 77-102.

SCHNEIDER, T.; KEIBLINGER, K. M.; SCHMID, E.; STERFLINGER-GLEIXNER, K.; ELLERSDORFER, G.; ROSCHITZKI, B.; RICHTER, A.; EBERL, L.; ZECHMEISTER-BOLTENSTERN, S.; RIEDEL, K. Who is who in litter decomposition Metaproteomics reveals major microbial players and their biogeochemical functions. **ISME Journal**, v. 6, n. 9, p. 1749–1762, 2012. doi: 10.1038/ismej.2012.11

SKIRYCYZ, A.; CASTILHO, A.; CHAPARRO, C.; CARVALHO, N.; TZOTZOS, G.; SIQUEIRA, J. O. Canga biodiversity, a matter of mining. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 1–9, 2014. doi: 10.3389/fpls.2014.00653

VICKERS, H.; GILLESPIE, M.; GRAVINA, A. Assessing the development of rehabilitated grasslands on post-mined landforms in north west Queensland, Australia. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 163, p. 72–84, 2012. doi: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2012.05.024>

WANG, D. Z.; KONG, L. F.; LI, Y.Y; XIE, Z. X.; Environmental Microbial Community Proteomics: Status, Challenges and Perspectives. **International Journal of molecular sciences.** v. 17, p. 1275-1295, 2016. doi: 10.3390/ijms17081275

WILLIAMS, T. J.; LONG, E.; EVANS, F.; DEMAERE, M. Z.; LAURO, F. M.; RAFTERY, M. J.; DUCKLOW, H.; GRZYMSKI, J. J.; MURRAY, A. E.; CAVICCHIOLI, R. A metaproteomic assessment of winter and summer bacterioplankton from Antarctic Peninsula coastal surface waters. **ISME Journal**, v. 6, n. 10, p. 1883–1900, 2012. doi: 10.1038/ismej.2012.28

YAO, Q.; LI, Z.; SONG, Y.; WRIGHT S. J.; GUO, X.; TRINGE, S. G.; PASA-TOLIC, L.; HAZEN, T. C.; TURNER, B. L.; MAYES, M. A.; PAN, C. Community proteogenomics reveals the systemic impact of phosphorus availability on microbial functions in tropical soil. **Nature ecology and evolution.** v.2, p. 499-509, 2018. doi: 10.1038/s41559-017-0463-5

ZAMPIERI, E.; CHIAPELLO, M.; DAGHINO, S.; BONFANTE, P.; MELLO, A. Soil metaproteomics reveals an inter-kingdom stress response to the presence of black truffles. **Scientific Reports.** v. 6, 2016. doi:10.1038/srep25773

1. METAPROTEÔMICA DE SOLOS ASSOCIADOS À CROSTA SUPERFICIAL DE FERRO NO SUDESTE BRASILEIRO

RESUMO

Os ecossistemas brasileiros de canga são caracterizados por condições abióticas severas que acomodam uma biodiversidade única e ameaçada. Cobrindo montanhas no Quadrilátero Ferrífero de Minas Gerais, Brasil, as cangas são cercadas por florestas semidecíduas sazonais do bioma Mata Atlântica. Neste estudo, comparamos o funcionamento molecular de comunidades do solo de uma floresta (SF) e um solo de canga (SC) desta região, usando uma abordagem metaproteômica do solo. Avaliamos as diferenças filogenéticas baseadas em peptídeos e diferenças funcionais de ambas amostras de solo utilizando a técnica 2D-LC-MS^e. No total, 373 proteínas diferentes foram identificadas neste estudo. Em SF, 356 proteínas foram identificadas, enquanto 147 foram detectadas em SC, 130 proteínas foram encontradas em ambos ambientes. A categorização funcional de sequências de proteínas recuperou um maior número de categorias em SC do que SF. No entanto, uma maior diversidade taxonômica foi observada no SF, enquanto que espécies capazes de tolerar condições ambientais rigorosas dominam a comunidade em SC. A análise metaproteômica revelou respostas moleculares de microrganismos e plantas em ambos os solos, confirmando sua capacidade de distinguir o funcionamento molecular em diferentes ambientes associados, ricos em ferro. No geral, a análise metaproteômica representou uma ferramenta poderosa para programas de monitoramento ambiental.

Palavras-chave: microbiologia do solo, funcionamento molecular, monitoramento ambiental, Quadrilátero Ferrífero

2.1 Introdução

Microrganismos do solo são os principais agentes dos ciclos biogeoquímicos, compõem uma porção considerável da biomassa do solo (KEIBLINGER et al., 2016; SILVA et al., 2018; THOMPSON et al., 2011;) e guiam a multifuncionalidade e serviços do ecossistema (BASTIDA; JEMLICH, 2016). Visando compreender os mecanismos para a manutenção de processos ecológicos, *e.g.*, decomposição e mineralização de materiais orgânicos e atividades de enzimas relacionadas aos ciclos de C, N, P e S (GRIFFITHS; PHILIPOT, 2013; MEDEIROS et al., 2017), o estudo da microbiota do solo é indispensável (HEIJDEN; BARDGETT; STRAALLEN, 2008). O uso da metaproteômica, *i.e.*, extração, isolamento, identificação e quantificação de proteínas utilizando tecnologias tais como a cromatografia líquida e espectrometria de massas (BASTIDA et al., 2009), permite a identificação de funções que estão de fato sendo realizadas no ambiente, possibilitando a correlação da diversidade da comunidade do solo com os processos moleculares com os quais estes estão envolvidos (YAO et al., 2018). Assim, o uso de tecnologia metaproteômica pode ajudar a relacionar respostas moleculares da comunidade microbiana do solo a mudanças em ecossistemas (BASTIDA; JEMLICH, 2016), representando ferramentas poderosas ao monitoramento ambiental (GASTAUER et al., 2018a).

A maioria dos estudos de metaproteômica de solos foram desenvolvidos em climas temperados da América do Norte ou Europa (BASTIDA; HERNÁNDEZ; GARCÍA, 2014; WANG et al., 2016). Contudo, padrões a respeito da funcionalidade de proteínas são pobremente compreendidos em solos sob clima tropical. Considerando elevadas taxas de degradação destes ecossistemas tropicais, o conhecimento sobre a microbiota de solo nativo e sua funcionalidade é urgentemente necessária para definir patamares de referência para esforços de conservação e reabilitação (GASTAUER et al., 2018b; MITRE et al., 2018).

Aqui, nós apresentamos a comparação da análise metaproteômica de dois solos, *i.e.*, um solo de canga e um de floresta, ambos nativos do Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, Brasil. Enquanto as florestas estacionais semidecíduas do bioma da Mata Atlântica dominam a região, as cangas são ecossistemas espacialmente limitados associados a crostas superficiais ricas em ferro (ZAPPI et al., 2016). Estas contêm uma biodiversidade única que evoluiu para se adaptar a condições ambientais rigorosas, como grandes amplitudes diárias de temperatura, alta radiação e solos rasos de baixa disponibilidade de nutrientes e água (JACOBI; CARMO, 2011; SILVEIRA et al., 2016; VIANA et al., 2016). Tipicamente desenvolvidas sobre minérios economicamente valiosos, as cangas são altamente ameaçadas por atividades de mineração (SKIRYCZ et al., 2014) destacando a importância de entender sua funcionalidade

(MITRE et al., 2018). Devido às condições ambientais mais adversas em comparação com os solos florestais, espera-se que os ambientes de canga carreguem baixos teores proteicos, embora uma gama mais ampla de processos biológicos possa ser necessária para sobrepor a severidade ambiental (ZAMPIERI et al., 2016).

Diante disso, o objetivo deste estudo foi detectar diferenças nas propriedades do solo entre ambos ambientes e identificar diferenças filogenéticas e funcionais na comunidade do solo. Por causa de condições abióticas menos severas, nós hipotetizamos que os solos sob vegetação de floresta apresentem maior conteúdo de proteína e maior diversidade filogenética do que os solos de canga. Além disso, espera-se que as proteínas derivadas das comunidades de canga pertençam a uma gama mais ampla de processos biológicos e funções moleculares, a fim de possibilitar a vida sob condições abióticas mais severas.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Locais de estudo, amostragem e análises químicas

A amostragem foi realizada em duas áreas nativas situadas em Nova Lima, no Quadrilátero Ferrífero, em Minas Gerais; nesta região o clima é subtropical úmido com invernos secos e verões chuvosos, correspondendo ao tipo Cwa segundo a classificação de Köppen (ANTUNES, 1986). Amostras de solo foram coletadas no final da estação chuvosa (março de 2015) em uma área de canga bem preservada (SC de solo de canga), coberta por uma formação de arbustos sobre afloramentos ferruginosos (20° 06 56.9" S 43° 57 13.0" O), e na floresta secundária adjacente pertencente ao bioma Mata Atlântica (SF de solo de floresta, 20° 07 40.5" S 43°55 03.6"O).

As amostras foram coletadas a uma profundidade de 0-10 cm em três parcelas de 6 x 25 m, totalizando três amostras por ambiente. Durante a coleta, os solos foram armazenados em sacos plásticos, que foram mantidos refrigerados por cubos de gelo. Ao chegar ao laboratório, as amostras foram armazenadas a -80 °C até a extração de proteína. Para a análise proteômica, as amostras das três parcelas foram homogeneizadas para produzir uma amostra composta por ambiente. Analisamos os atributos químicos de ambas as amostras de solo. Para isso, os solos foram secos ao ar e peneirados usando uma malha de 2 mm. O pH foi determinado na proporção solo-água de 1:2,5 e o teor de matéria orgânica no solo (MOS) foi medido pelo método do dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇). P, K, Zn, Fe e Mn disponíveis foram determinados pelo método Mehlich-1 (0,05 mol.L⁻¹ HCl, 0,0125 mol.L⁻¹ H₂SO₄). O Ca, Mg e Al trocáveis foram medidos por espectrometria de absorção atômica com extratos de KCl 1M adicionados ao óxido de lantânio (EMBRAPA, 2009).

2.3.2 Carbono da biomassa microbiana, respiração basal do solo e metabolismo do solo

O carbono da biomassa microbiana foi determinado através do método de fumigação-extração (VANCE; BROOKES; JENKINSON, 1987). A respiração basal do solo foi estimada pela liberação de CO₂ das amostras de solo incubadas com 0.05 mol L⁻¹ NaOH por um período de três dias (ALEF; NANNIPIERI, 1995). O quociente metabólico (qCO₂) foi derivado da taxa de respiração basal e do carbono da biomassa microbiana (ANDERSON; DOMSCH, 1993).

2.3.3 Extração de proteínas

O isolamento de proteínas foi realizado de acordo com Wang et al. (2006), com algumas modificações. De cada amostra composta foram adicionados 3 g de solo a 7,0 mL de tampão de extração [sacarose 0,85 M, Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0), dodecilsulfato de sódio (SDS) a 2% (w/v), fluoreto de fenilmetilsulfonil 1 mM e 2% (w/v) de polivinilpolipirrolidona]. Em seguida, adicionou-se 3 mM do inibidor de protease Protease Inhibitor Cocktail Powder (Sigma117 Aldrich) e 5% (v/v) de 2-mercaptoetanol. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos antes da realização de cinco eventos de sonicação (30 segundos de duração por evento e intervalos de 30 segundos entre eles). Cada amostra foi fracionada em dez microtubos e homogeneizada individualmente com 700 µL de fenol saturado (pH 8,0). Após centrifugação a 14.000 rpm por 7 min a 4 °C, a fase fenólica de cada alíquota foi coletada e combinada em novos microtubos, seguida de outra centrifugação a 14.000 rpm por 7 min a 4 °C para remover qualquer resíduo de SDS ou da fase aquosa. A fase fenólica foi coletada e as proteínas foram precipitadas incubando as amostras com 1,3 mL de acetato de amônio 0,1 M (preparado em metanol absoluto a -20 °C) a -80 °C durante a noite. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 4 min a 4 °C e o sobrenadante foi cuidadosamente descartado. O precipitado de proteína restante foi limpo duas vezes com 1,5 mL de acetona gelada a 80% (v/v) e etanol gelado. Finalmente, o precipitado resultante foi seco em um concentrador a vácuo por 7 min e as proteínas foram solubilizadas pela adição de 100 µL de tampão ureia-tioureia (ureia 7 M e tioureia 2M) e armazenada a -80° até a digestão de proteínas e dessalinização.

2.3.4 Digestão de proteínas e dessalinização das amostras

50 microgramas de proteínas foram utilizados por amostra, e 8 M de uréia foi adicionado para um volume final de 150 µL. A preparação da digestão envolveu a redução de proteínas com ditioneitol (DTT, 5 mM) e incubação por 25 minutos a 56 °C, seguida da

alquilação com iodoacetamida (IAA, 14 mM) por 30 minutos a temperatura ambiente. IAA residual foi removida ao adicionar DTT (5 mM) e incubar por 15 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram diluídas em 1:5 com bicarbonato de amônio (50 mM), seguidas da adição de CaCl₂ (1 mM) e tratamento com tripsina (20 ng/μL) por 16 horas a 37° C. Subsequentemente, ácido trifluoroacético (TFA) foi adicionado para uma concentração final de 0.4% para parar a reação enzimática.

Colunas de fase sólida Sep-Pak C18 (Waters, Milford) com 1 mL de capacidade foram ativadas com 3 mL de acetonitrila (ACN, 100%) e então equilibradas com 1 mL de ACN 50% contendo 0.1% de ácido fórmico e com 3 mL de TFA. As amostras foram individualmente carregadas, limpas com 3 mL de 0.1% de TFA e equilibradas com 1 mL de 0.1% de ácido fórmico. A eluição foi realizada com 2 mL de ACN 50% e 1 mL de 80% ACN contendo 0.1% de ácido fórmico. Finalmente, as amostras foram secas em concentrador a vácuo e ressuspendidas em 50 μL de formiato de amônio (10 mM) e então injetadas no cromatógrafo líquido 2D de ultra performance acoplado ao espectrômetro de massas (Waters, Milford).

Um sistema nanoACQUITY UPLC (Waters, Millford MA) foi configurado para um fracionamento 2D. Na primeira dimensão, uma coluna analítica XBridge BEH130 C18 (5 μm, 300 μm x 50 mm) foi utilizada em um fluxo de 2 μL.min⁻¹, e na segunda dimensão, uma coluna *trap* C18 (5 μm, 180 μm x 20 mm), acoplada com uma coluna analítica BEH130 C18 (1.7 μm, 100 μm x 100 mm), foi usada a um fluxo de 400 nL.min⁻¹. Para este experimento nós utilizamos um método de fracionamento das amostras em 5 etapas usando um gradiente de 10.8%, 14.0%, 16.7%, 20.4%, e 65.0% de acetonitrila. A cromatografia foi acoplada diretamente a um espectrômetro de massa ESI-Q-ToF Synapt G2S (Waters), configurada para operar em um modo positivo com fragmentação contínua (MS^E), com a energia de colisão variando de 5 a 40 eV.

2.3.5 Análise dos dados

Os dados brutos foram processados utilizando Proteinlynx Global Server 3.0.2. (PLGS). Para isso, pesquisas foram realizadas no PLGS contra uma base de dados composta por sequências de bactérias, plantas e fungos (contendo 336 171 sequências de bactérias, 6 397 sequências de plantas e 33 362 sequências de fungos). Carbamidometilação no C-terminal (+57) foi definido como modificação fixa e modificações variáveis foram definidas como a seguir: -1 em (Amidação+C-Terminal), +1 em N (Desaminado), +16 em M (Oxidação), + 80 em (Fosforil+STY), +98 em STY (Fosforil STY). A tolerância do íon fragmentado e do íon parental foi definida como automático e a Taxa de Falsa Descoberta

(TFD) foi definida em 100 para permitir validação adicional e recálculo apropriado de identificação de probabilidades no Scaffold Proteome Software 4 (Proteome software, Portland).

Em uma segunda etapa, os resultados de PGLS foram exportados para o Scaffold Proteome Software 4 para permitir a validação e visualização. Uma segunda busca foi realizada contra a mesma base de dados (Uniprot Bactéria, Fungos e Plantas). Neste ponto a TFD foi calculada pelos algoritmos PeptideProphet e Protein prophet (Nesvizhskii et al., 2003). Peptídeos foram aceitos quando a TFD calculada fosse menor que 2,5%, para proteínas nós definimos menor do que 7% como limiar.

A anotação funcional de proteínas foi realizada utilizando o software Blast2GO PRO versão 4.0 (Biobam) usando os parâmetros padrão. Para isto, proteínas identificadas foram agrupadas em categorias funcionais utilizando a base de dados do Gene Ontology (<http://www.geneontology.org>) com respeito aos seus processos biológicos, funções moleculares e componentes celular. Por fim, uma árvore filogenética foi construída utilizando o método do menor ancestral comum (LCA, em inglês) baseado na lista de peptídeos identificados, utilizando a ferramenta de busca online Unipept (<https://unipept.ugent.be/>) (MESUERE et al., 2015).

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Atributos do solo e atividade microbiana

O SC mostrou maior valor de pH e maior disponibilidade de Ca e S (Tabela 2). A disponibilidade dos demais nutrientes é maior em SF.

Tabela 2. Valores médios da análise química em solo de canga (SC) e solo de floresta (SF). t=CTC efetiva; T=CTC potencial; V=saturação por bases; m=saturação por alumínio.

	pH	K	P	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	t	T	V	m	M.O.	Zn	Fe	Mn	S
H ₂ Omg dm. ⁻³ ...																
SC	5,9	28,0	1,0	0,5	0,2	0,1	3,4	0,7	0,8	4,1	17,0	12,9	3,5	0,5	50,7	16,3	42,4
SF	4,7	31,0	3,1	0,4	1,1	1,1	13,0	1,6	2,7	14,6	10,9	41,3	4,9	3,1	68,5	151,4	12,3

Ademais, nós encontramos maiores quantidades de carbono da biomassa microbiana em SF do que em SC (Figura 1). No entanto, a respiração basal do solo e o quociente metabólico foram maiores em SC do que em SF. Esses achados confirmam condições mais estressantes no SC do que no SF. Estudos semelhantes também revelaram valores mais altos

de qCO_2 em ambientes mais estressantes (EVANGELISTA et al., 2013; KASCHUK; ALBERTON; HUNGRIA., 2011). Além disso, nossos resultados de qCO_2 em SC confirmam medições prévias em solos de canga durante a estação seca (SILVA et al. 2018), embora esses autores tenham encontrado alta variação em qCO_2 em função da sazonalidade e maiores valores de qCO_2 para solos florestais do que os observados neste estudo. Além disso, esses autores encontraram maior respiração basal do solo e biomassa microbiana do que nossos resultados para SC. Como cangas são ecossistemas heterogêneos compostos de fitofisionomias distintas ocupando diferentes posições ao longo de gradientes ambientais de disponibilidade de nutrientes e água (MITRE et al. 2018, MOTA et al., 2018; SCHAEFER et al., 2015), variações nos atributos bioquímicos do solo, incluindo composição proteica, são esperados.

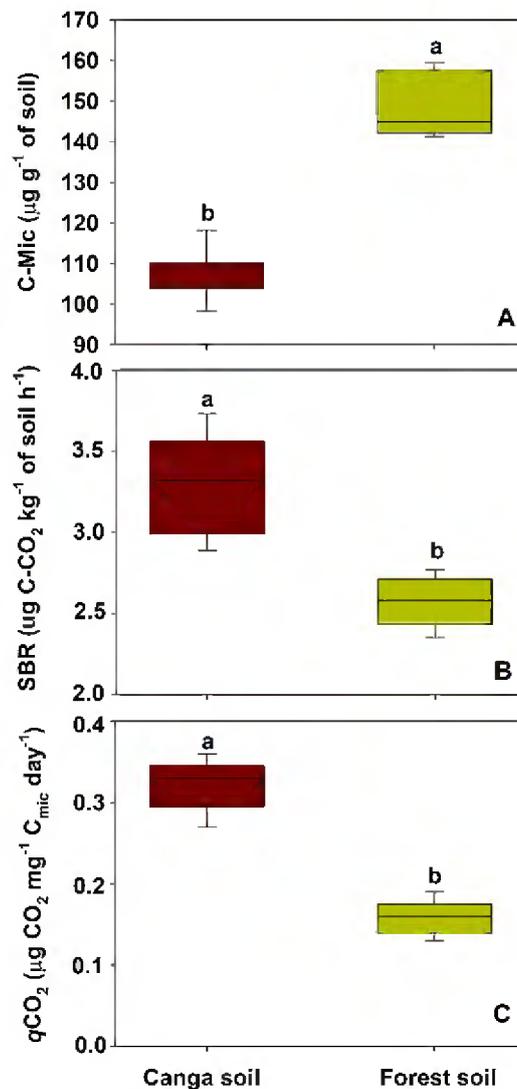


Figura 1. Carbono da biomassa microbiana (C-Mic) (A), Respiração Basal do Solo (SBR) (B) e quociente metabólico (qCO_2) (C) em solos de canga (vermelho) e de floresta (verde claro). Barras com letras diferentes diferem no teste de Tukey a 5%.

2.3.2 Proteínas identificadas e suas categorias funcionais

Ao todo, 373 proteínas diferentes foram identificadas neste estudo. Destas, 356 proteínas foram detectadas no SF, enquanto 147 foram registradas no SC. 130 proteínas foram comuns em ambos os ambientes. Entre as proteínas identificadas em ambos tipos de solo, 219 pertencem a bactérias, 35 a fungos e 119 a plantas. A maior abundância proteica observada no SF pode estar associada às condições ambientais favoráveis para maior abundância e diversidade microbiana (MORRIS; BLACKWOOD, 2007), como maior disponibilidade de nutrientes, menor relação C/N e maior conteúdo de MOS (Tabela 2).

Apesar do número superior de proteínas identificadas em SF, um maior número de processos biológicos, funções moleculares e componentes celular (Figura 2) foram observados em SC, totalizando 66 categorias funcionais em SC comparadas a 42 no SF. O número superior de categorias funcionais em SC indica um maior arsenal bioquímico e diversidade de processos moleculares na vida microbiana, necessário a sobrevivência no ambiente mais desafiador de canga. Achados semelhantes foram relatados por Zampieri et al. (2016), que identificaram um maior número de categorias funcionais em solos “estressados” em uma área afetada pelo fungo do gênero *Tuber* (terra de trufas) do que em solo de floresta.

Nós observamos que “redobramento de proteínas (GO:0042026)” foi o processo biológico GO mais relevante em ambos ambientes (Figura 2). Chaperonas, proteínas bem conhecidas envolvidas neste processo, foram as proteínas mais abundantes neste estudo (APÊNDICE A – Tabela S1). Chaperonas respondem a condições de estresses ambientais, tais como seca, calor e frio, bem como a químicos e a outros estresses, prevenindo a agregação e auxiliando no redobramento de proteínas não nativas (ZAMPIERI et al., 2016). Assim, nossos resultados indicam que ambas amostras tiveram origem de ambientes oligotróficos, suscetíveis a uma variedade de condições que são adversas aos microrganismos (HOBBIE; HOBBIE, 2013; PEPPER et al., 2015). Isto é, devido a condições que são distantes das ideais (*e.g.*, meio de cultura) microrganismos são auxiliados por chaperonas para reestabelecer conformações proteicas normais, alcançando a homeostase celular (HARUTA; KANNO, 2015).

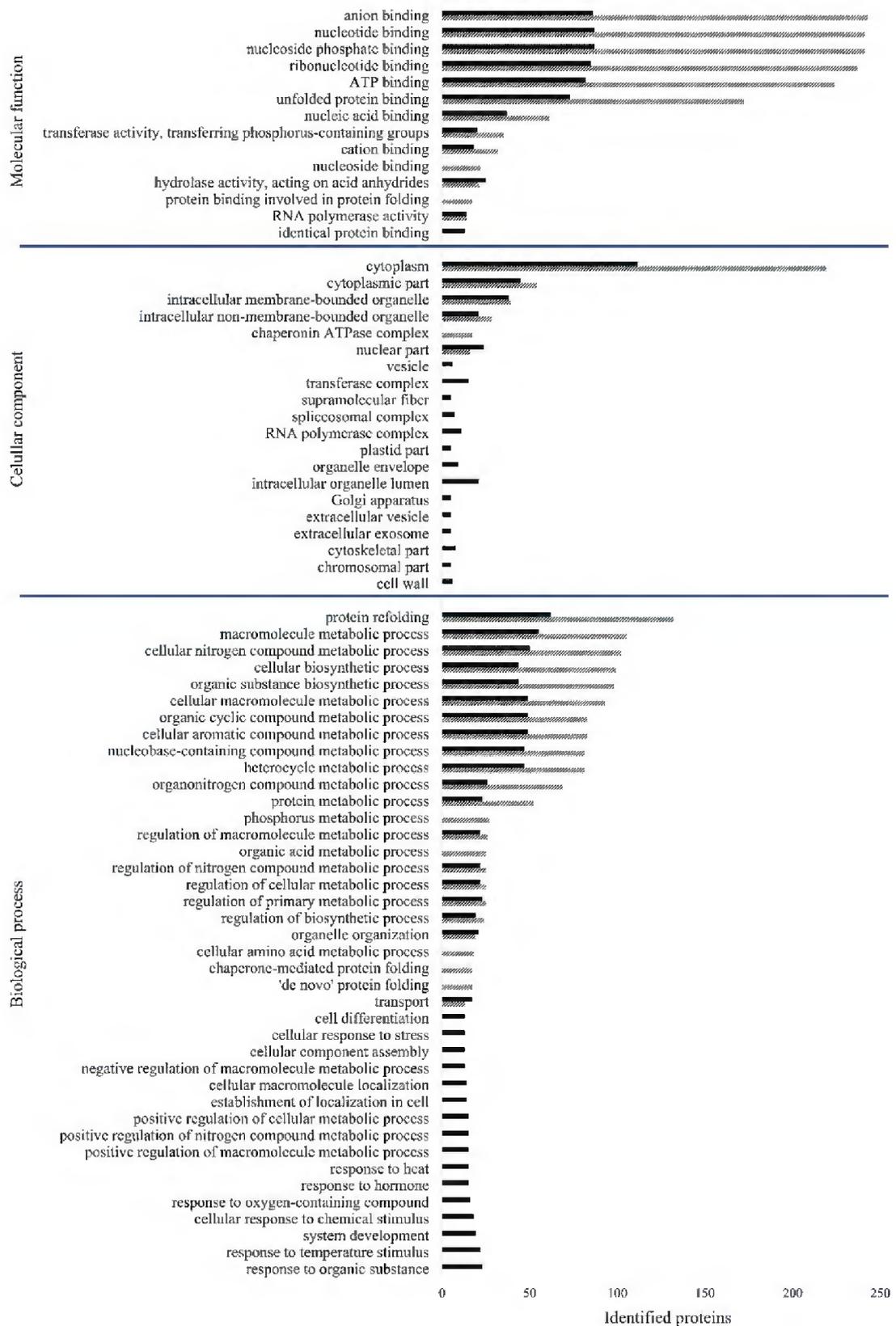


Figura 2. Categorização funcional de proteínas do solo isoladas de floresta (barras hachuradas) e de canga (barras sólidas). As barras indicam o número de proteínas categorizadas em cada processo biológico, função molecular e componente celular.

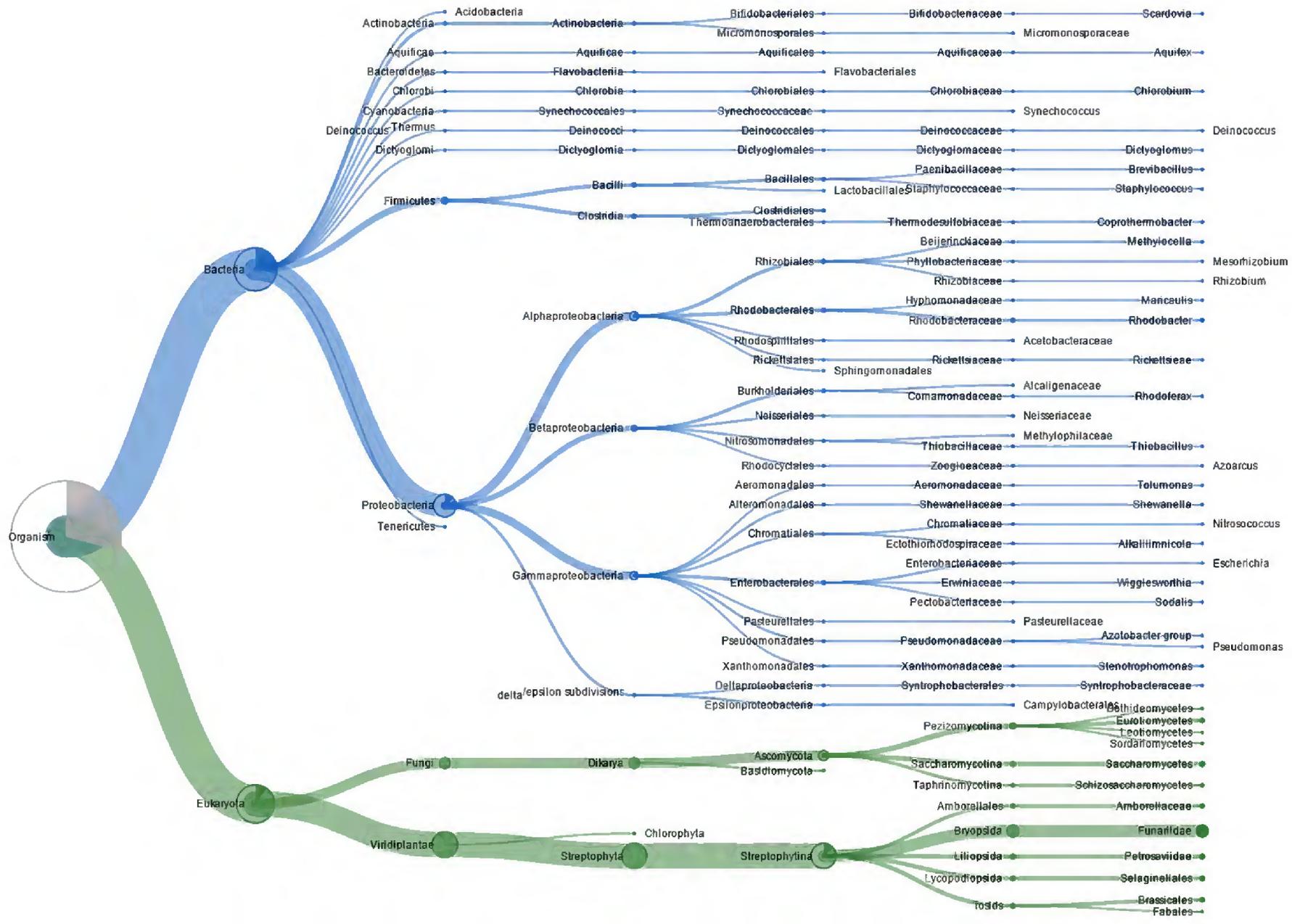
Alguns processos em SF relacionados à biossíntese de moléculas, como “processo de biossíntese celular (GO: 0044249)” e “processo de biossíntese de substância orgânica (GO: 1901576)”, tiveram mais que o dobro de proteínas identificadas neste solo do que em SC. Em contraste, processos relacionados a estresses ambientais como “resposta celular ao estresse (GO: 0033554)” e “resposta ao calor (GO: 0009408)” foram detectados apenas em SC, contendo 13 e 15 proteínas, respectivamente. Estes resultados refletem a influência ambiental no metabolismo microbiano; floresta (a qual teve valores superiores na maior parte dos nutrientes e em MOS) mostrou maiores níveis de biossíntese de compostos orgânicos, enquanto que restrições ambientais no ambiente de canga, mais severo, direcionou o metabolismo microbiano à manutenção celular e resgate, ao custo de redução da biossíntese de compostos orgânicos. Este balanço fisiológico permite aos organismos sobreviverem sob condições de estresse, embora suas taxas de reprodução e desenvolvimento sejam comprometidas (LÓPEZ-MAURY; MARGUERAT; BÄHLER, 2008; NADAL et al., 2011; ATKINSON; URWIN, 2012).

Neste estudo, importantes enzimas relacionadas ao ciclo do enxofre e nitrogênio foram identificadas; duas enzimas essenciais à assimilação de enxofre, ATP sulfirilase (EC 2.7.7.4) e APS quinase (EC 2.7.1.25), foram encontradas em SF. Estas proteínas sucessivamente transformam o SO_4^{2-} a 3-fosfoadenosina-5-fosfosulfato, uma molécula chave na via de assimilação de enxofre (PEPPER et al., 2015). Além disso, nós detectamos a enzima nitrogenase em FS, enzima de suma importância ao ciclo do nitrogênio devido sua habilidade em catalisar a conversão de N_2 a uma forma biologicamente acessível, NH_3 (HOFFMAN et al., 2014).

2.3.3 Diversidade microbiana baseada em peptídeos

O dendrograma baseado em peptídeos (Figura 3) indica maior diversidade taxonômica em SF (147 táxons) do que em SC (68 táxons), o que é consistente com o número superior de peptídeos identificados na amostra do solo de floresta. Novamente, condições mais favoráveis no SF permitiram mais espécies se estabelecerem. Ademais, esperamos maior deposição de folhas e outros componentes orgânicos neste ambiente, cuja decomposição fornece energia a microrganismos. O SC apresentou menor número de táxons, consistente com maior pressão seletiva neste ambiente induzido por menor disponibilidade de nutrientes ou fontes de carbono recalcitrantes (SCHAEFER et al., 2015).

a)



b)

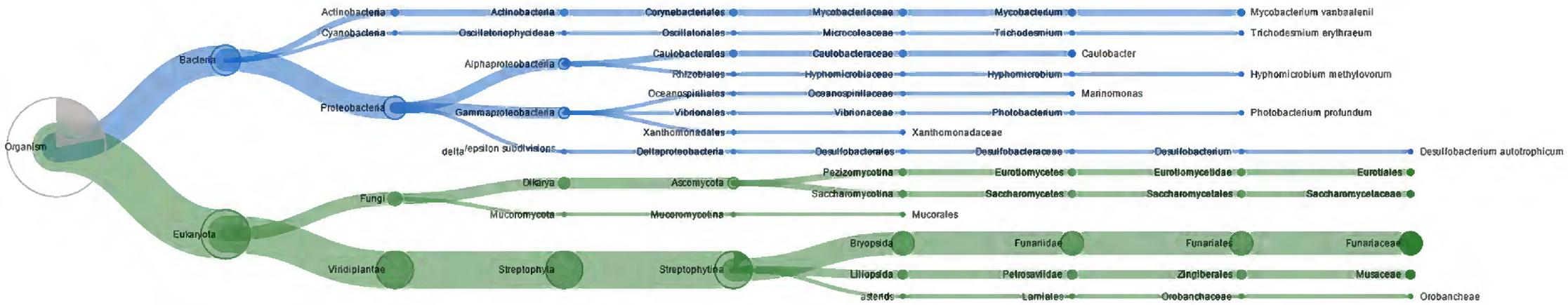


Figura 3. Dendogramas baseados em peptídeos construído pelo Unipept. As árvores filogenéticas foram construídas baseadas na lista de peptídeos identificados utilizando o método Menor Ancestral Comum (LCA). “a” é de SF e “b” corresponde ao SC.

Além disso, SC sofre com variações extremas de água e temperatura, representando fortes filtros para a vida acima e abaixo do solo (MITRE et al., 2018). É importante reforçar que a diversidade biológica foi inferida a partir dos peptídeos que foram identificados em amostras de solo, *i.e.*, representando a parte (mais) ativa da biota do solo.

Considerando as severas condições no ambiente de SC, algumas espécies detectadas merecem atenção, entre estas a bactéria redutora de sulfato *Desulfobacterium autotrophicum*. Com seu metabolismo versátil, esta espécie é quimioautotrófica, mas também pode usar compostos orgânicos como fonte de energia (STRITTMATTER et al., 2009). Ademais, o musgo *Funaria hygrometrica* é uma espécie reconhecida por sua tolerância a dissecação (PROCTOR et al., 2007). A bactéria simbiótica fixadora de nitrogênio *Mesorhizobium japonicum* pode ser de grande relevância a plantas em ambientes de canga, caracterizados por baixa disponibilidade de nitrogênio (MITRE et al., 2018).

No SF mais espécies de simbioses foram identificadas. Peptídeos de bactérias simbioses do gênero *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium* e *Rhizobium* foram encontradas, as quais a interação com plantas são descritas na literatura e são essenciais ao suprimento de nitrogênio atmosférico a plantas (ROSENBERG et al., 2013).

2.4 Conclusão

Nossos dados mostram que a metaproteômica tem o potencial de revelar os atributos funcionais do solo através da identificação de proteínas-chave envolvidas em ciclos biogeoquímicos. A análise metaproteômica permitiu a comparação dos perfis proteicos de uma floresta e de um solo de canga, evidenciando que o solo de floresta teve maior biodiversidade e capacidade de responder metabolicamente a maiores teores de nutrientes e de MOS.

Ao identificar diferenças entre os ambientes examinados, estudos em metaproteômica provêm uma importante ferramenta para estudar a ecologia do solo e o funcionamento da comunidade microbiana. Sendo assim abordagens promissoras ao monitoramento ambiental quanto a alterações decorrentes de mudanças climáticas ou de uso da terra, impactos antropogênicos ou reabilitação de ecossistemas degradados. Dados sobre a diversidade proteica apresentados aqui podem ser considerados ponto de referência para estudos posteriores em ambientes similares.

2.5 Referências

ALEF, K., NANNIPIERI, P.B.T.M. in A.S.M. and B. (Eds.), 1995. 5. Estimation of microbial activities. Academic Press, London, p. 193–270.

ANDERSON, T. H., DOMSCH, K.H., 1993. The metabolic quotient for CO₂ (q_{CO_2}) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 25, p. 393–395. doi: 10.1016/0038-0717(93)90140-7

ANTUNES F. Caracterização climática do estado de Minas Gerais. Informe Agropecuário, v.12, p. 9-13. 1986.

ATKINSON, N. J., URWIN, P. E., 2012. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 3523-3543. doi: 10.1093/jxb/ers100

BASTIDA, F.; HERNÁNDEZ, T., GARCÍA, C. Metaproteomics of soils from semiarid environment: Functional and phylogenetic information obtained with different protein extraction methods. **Journal of Proteomics**, v. 101, p. 31-42, 2014. doi: 10.1016/j.jprot.2014.02.006

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, p. 845-859, 2009. doi: 10.1111/j.1365-2389.2009.01184.x

BASTIDA, F.; N. JEHLICH. It's all about functionality: How can metaproteomics help us to discuss the attributes of ecological relevance in soil? **Journal of Proteomics**. v. 144, p. 159-161, 2016. doi: 10.1016/j.jprot.2016.06.002

EVANGELISTA, C. R.; PARTELLI, F. L.; FERREIRA, E. P. B.; PIRES, F. R. Atributos microbiológicos do solo na cultura da cana-de-açúcar sob manejo orgânico e convencional. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 4, p. 1549-1562, 2013. doi: 10.5433/1679-0359.2013v34n4p1549

GASTAUER, M.; SILVA, J. R.; CALDEIRA JUNIOR, C. F.; RAMOS, S. J.; SOUZA FILHO, P. W. M.; FURTINI NETO, A. E.; SIQUEIRA, J. O. Mine land rehabilitation: Modern ecological approaches for more sustainable mining. **Journal of Cleaner Production**, v. 172, p. 1409–1422, 2018a.

GASTAUER, M.; SOUZA FILHO, P. W. M.; RAMOS, S. J.; CALDEIRA, C. F.; SILVA, J. R.; SIQUEIRA, J. O.; FURTINI NETO, A. E. Mine land rehabilitation in Brazil: Goals and techniques in the context of legal requirements. **Ambio**, v. 48, p. 47-88, 2018b. doi: 10.1007/s13280-018-1053-8

GRIFFITHS, B. S.; PHILIPPOT, L. Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. **Fems microbiology**, v. 37, p.112-129, 2013. doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00343

HARUTA, S.; KANNO, N. Survivability of Microbes in Natural Environments and Their Ecological Impacts. **Microbes and environment**, v. 30, p. 123-125, 2015. doi: 10.1264/jsme2.ME3002rh

HEIJDEN, M. G. A.; BARDGETT, R. D.; STRAALLEN, N. M. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. **Ecology letters**, v. 11, p. 296-310, 2008. doi: 10.1111/j.1461-0248.2007.01139.x

HOBBIE, J. E.; HOBBIE, E. A. Microbes in nature are limited by carbon and energy: the starving-survival lifestyle in soil and consequences for estimating microbial rates. **Frontiers in microbiology**, v. 4, 2013. doi: 10.3389/fmicb.2013.00324

HOFFMAN, B. M.; LUKOYANOV, D.; YANG, Z. Y.; DEAN, D. R.; SEEFELDT, L. C. Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: the next stage. **Chemical review**, v. 114, p. 4041-4062, 2014. doi: 10.1021/cr400641x

JACOBI, M. C., CARMO, F.F. Life-forms, pollination and seed dispersal syndromes in plant communities on ironstone outcrops, SE Brazil. **Acta Botanica Brasílica**, 25, 395-412. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062011000200016>

KASCHUK, G., ALBERTON, O.; HUNGRIA, M. Quantifying effects of different agricultural land uses on soil microbial biomass and activity in Brazilian biomes: inferences to improve soil quality. **Plant Soil**, v. 338, p. 467-81. 2011. doi: 10.1007/s11104-010-0559-z

KEIBLINGER, K. M., FUCHS, S., BOLTENSTERN, S.Z., RIEDEL, K. Soil and leaf litter metaproteomics – a brief guideline from sampling to understanding. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, p. 66-74, 2016. doi: 10.1093/femsec/fiw180

LÓPEZ-MAURY, L.; MARGUERAT, S.; BÄHLER, J. Tuning gene expression to changing environments: From rapid responses to evolutionary adaptation. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, p. 583-593, 2008. doi: 10.1038/nrg2398

MEDEIROS, E. V., DUDA, G. P., SANTOS, L. A. R., LIMA, J. R. S., ALMEIDA-CORTÊZ, J. S., HAMMECKER, C., LARDY, L., COURNAC, L., 2017. Soil organic carbon, microbial biomass and enzyme activities responses to natural regeneration in a tropical dry region in Northeast Brazil. **Catena**, 151, 137-146. doi: 10.1016/j.catena.2016.12.012

MELLO, A.; ZAMPIERI, E. Who is out there? What are they doing? Application of metagenomics and metaproteomics to reveal soil functioning. **Italian Journal of Mycology**, v. 46, p. 1-7, 2017. doi: 10.6092/issn.2531 – 7342/6647

MESUERE, B., DEBYSER, G., AERTS, M., DEVREESE, B., VANDAMME, P., DAWYNDT, P., 2015. The Unipept metaproteomics analysis pipeline. **Proteomics**, 15, 1437–1442. DOI:10.1002/pmic.201400361

MITRE, S. K., MARDEGAN, S. F., CALDEIRA, C. F., RAMOS, S. J., NETO, A. E. F., SIQUEIRA, J. O., GASTAUER, M., 2018. Nutrient and water dynamics of Amazonian canga vegetation differ among physiognomies and from those of other neotropical ecosystems. **Plant Ecology**, 219, 1341–1353. doi: <https://doi.org/10.1007/s11258-018-0883-6>

MORRIS, S. J., BLACKWOOD, C. B. The ecology of soil organisms. In: Paul, E. A. (ed.), **Soil microbiology, ecology and biochemistry**. 3. ed. Jordan Hill: Elsevier. 2007. p. 195-229.

MOTA, N. F. O., WATANABE, M. T. C., ZAPPI, D. C., HIURA, A. L., PALLOS, J., VIVEROS, R. S., GIULIETTI, A. M., VIANA, P. L., 2018. Cangas da Amazônia: a vegetação única de Carajás evidenciada pela lista de fanerógamas. **Rodriguésia**, 69, 1435-1488. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/2175-7860201869336>

NADAL, E. DE; AMMERER, G.; POSAS, F. Controlling gene expression in response to stress. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 12, p. 833–845, 2011. doi: 10.1038/nrg3055

NESVIZHSKII, A.; KELLER, A.; KOLLER, E.; AEBERSOLD, R. A statisticiam model for identify proteins by tandem mass spectrometry. **Analitical Chemistry**, v. 75, n. 17, p. 4646-4658. 2003. doi: 10.1021/ac0341261

NUNES, J. A.; SHAEFER, C. E. G. R.; JÚNIOR, W. G. F.; NERI, A. V; CORREA, G. R.; NEAL, J. E. Soil-vegetation relationships on a banded ironstone island, Carajás Plateau, Brazilian Eastern Amazonia. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.87, n.4, 2015. doi: 10.1590/0001-376520152014-0106

PEPPER, I. L.; GERBA, C. P.; GENTRY, T. J. **Environmental Microbiology**. 3. ed. San Diego: ELSEVIER. 2015.

PROCTOR, M. C. F.; OLIVER, M. J.; WOOD, A. J.; STARK, L. R.; CLEAVITT, N. L.; MISHLER, B. D. Desiccation-tolerance in bryophytes: a review. **The Bryologist**, v. 110, p. 595-621, 2007. doi: [https://doi.org/10.1639/0007-2745\(2007\)110\[595:DIBAR\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1639/0007-2745(2007)110[595:DIBAR]2.0.CO;2)

ROSENBERG, E. **The prokaryotes**. 4. ed. Heidelberg: Springer, 2013. doi: 10.1007/978-3-642-30141-4

SCHAEFER, C. E.; CÂNDIDO, H. G.; CORRÊA, G. R.; PEREIRA, A.; NUNES, J. A.; SOUZA, O. F.; MARINS, A.; FILHO, E. F.; KER, J. C. Solos desenvolvidos sobre canga ferruginosa no Brasil: uma revisão crítica e papel ecológico de termiteiros. In: CARMO, F. F. & KAMINO L. H. Y. *Geossistemas Ferruginosos do Brasil: Áreas Prioritárias para a Conservação da Diversidade Geológica e Biológica, Patrimônio Cultural e Serviços Ambientais*. Belo Horizonte: 3i editora, 2015. p. 77-102.

SILVA, A. O., da COSTA, A. M., TEIXEIRA, A. F. S., GUIMARÃES, A. A., dos SANTOS, J. V., MOREIRA, F. M. S., 2018a. Soil microbiological attributes indicate recovery of an iron mining area and of the biological quality of adjacent phytophysionomies. **Ecological Indicators**, 93, 142-151. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.04.073>

SILVA, F.C. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. 2.ed. rev. 465 e ampl. Brasília: **EMBRAPA**, 2009. 627p

SILVEIRA, F. A. O., NEGREIROS, D., NEWTON, P. U. B., BUISSON, E., CARMO, F. F, CARSTENSEN, D. W., CONCEIÇÃO, A. A., CORNELISSEN, T. G., ECHTERNACHT, L., FERNANDES, G. W., GARCIA, Q. S., GUERRA, T. J., JACOBI, C. M., LEMOS-FILHO, J. P., LE STRADIC, S., MORELLATO, L. P. C., NEVES, F. S., OLIVEIRA, R. S.,

- SCHAEFER, C. E., VIANA, P. L., LAMBERS, H., 2016. Ecology and evolution of plant diversity in the endangered campo rupestre: a neglected conservation priority. **Plant and soil**, 403, 129-152. doi: 10.1007/s11104-015-2637-8
- SKIRYCYZ, A.; CASTILHO, A.; CHAPARRO C.; CARVALHO, N.; TZOTZOS, G.; SIQUEIRA, J. Canga biodiversity, a matter of minning. **Frontiers in plant science**. v. 5, p. 1-9, 2014. doi: 10.3389/fpls.2014.00653
- STRITTMATTER, A.W.; LIESEGANG, H.; DECKER, I.; AMANN, J., ANDRES; S., HENNE; A., FRICKE, W.F.; MARTINEZ-ARIAS, R.; BARTELS, D.; GOESMANN, A.; KRAUSE, L.; PHLER, A.; KLENK, H.P.; RICHTER, M.; SCHLER, M.; GLÖCKNER, F.O.; MEYERDIERKS, A.; GOTTSCHALK, G.; AMANN, R. Genome sequence of *Desulfobacterium autotrophicum* HRM2, a marine sulfate reducer oxidizing organic carbon completely to carbon dioxide. **Environmental Microbiology**, v. 11, p. 1038-1055. 2009. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01825
- THOMPSON, I. D.; OKABE, K.; TYLIANAKIS, J. M.; KUMAR, P., BROCKERHOFF, E. G.; SCHELLHORN, N. A.; PARROTTA, J. A.; NASI, R. Forest biodiversity and the delivery of ecosystem goods and services: translating science into policy. **Bioscience**, v. 61, p. 972–981, 2011. doi: 10.1525/bio.2011.61.12.7
- VANCE, E.D., BROOKES, P.C., JENKINSON, D.S., 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biol. Biochem**, 19, 703–707. doi:10.1016/0038-0717(87)90052-6
- VIANA, P. L., MOTA, N. F. O., GIL, A. S. B., SALINO, A., ZAPPI, D. C., HARLEY, R. M., ILKIU-BORGES, A. L., SECCO, R. S., ALMEIDA, T. E., WATANABE, M. T. C., SANTOS, J. U. M., TROVÓ, M., MAURITY, C., GIULIETTI, A. M. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: história, área de estudos e metodologia. **Rodriguésia**, 67, 1107-1124. 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860201667501>
- WANG, D. Z.; KONG, L. F.; LI, Y.Y; XIE, Z. X.; Environmental Microbial Community Proteomics: Status, Challenges and Perspectives. **International Journal of molecular sciences**. v. 17, p. 1275-1295. 2016. doi: 10.3390/ijms17081275
- WANG, W.; VIGNAN, R.; SCALI, M.; CRESTI, M. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. **Electrophoresis**. v. 27, p. 2782-2786, 2006. doi: 10.1002/elps.200500722
- YAO, Q.; LI, Z.; SONG, Y.; WRIGHT S. J.; GUO, X.; TRINGE, S. G.; PASA-TOLIC, L.; HAZEN, T. C.; TURNER, B. L.; MAYES, M. A.; PAN, C. Community proteogenomics reveals the systemic impact of phosphorus availability on microbial functions in tropical soil. **Nature ecology and evolution**. v.2, p. 499-509. 2018. doi: 10.1038/s41559-017-0463-5
- ZAMPIERI, E.; CHIAPELLO, M.; DAGHINO, S.; BONFANTE, P.; MELLO, A. Soil metaproteomics reveals an inter-kingdom stress response to the presence of black truffles. **Scientific Reports**. v. 6, 2016. doi: 10.1038/srep25773.
- ZAPPI, D. C., MORO, M., F., MEAGHER, T. R., LUGHADHA, E. N. Plant Biodiversity Drivers in Brazilian Campos Rupestres: Insights from Phylogenetic Structure. **Frontiers in Plant Science**, 8. 2016. doi: 10.3389/fpls.2017.02141

3. METAPROTEÔMICA COMPARATIVA DE SOLOS DE ÁREAS MINERADAS EM RECUPERAÇÃO NO NORTE BRASILEIRO

RESUMO

Na região da Serra dos Carajás, Amazônia Oriental, encontram-se minas de areia. Estas ao serem exploradas resultam em significativa alteração da paisagem, tendo em vista a completa supressão da vegetação, remoção das camadas de topsoil e perdas de recursos bióticos. Com isso, leis ambientais no Brasil requerem medidas de compensação para impactos na biodiversidade e nos recursos naturais. A partir de proteínas identificadas na análise metaproteômica, podemos avaliar as diferenças funcionais da comunidade microbiana e vegetal, além de verificar diferenças filogenéticas de grupos bacterianos entre as áreas em estudo, no intuito de gerar dados moleculares que sirvam ao monitoramento ambiental e que auxiliem na tomada de decisão em projetos de recuperação de áreas degradadas (RAD). Foi realizado o isolamento de proteínas de amostras compostas de solos de uma cronossequência de projetos de RAD, área nativa e um solo exposto na serra dos Carajás. As proteínas foram identificadas por cromatografia líquida bi-dimensional acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (2D-LC-MS/MS). A metaproteômica mostra maior quantidade de proteínas identificadas em áreas de RAD e solo nativo em relação ao solo exposto: 336 em RAD Inicial (RI), 329 em RAD Avançado 12 anos (RA12), 219 em RAD Avançado 14 anos (RA14) e 291 em Solo Nativo (SN), contra 40 proteínas identificadas em Solo Exposto (SE). Embora RI tenha maior quantidade de proteínas, ao se verificar a abundância de grupos bacterianos, a categorização funcional em processos biológicos, maiores similaridades são encontradas entre as áreas de recuperação avançada e solo nativo, demonstrando o sucesso de reabilitação, ao menos do ponto de vista bioquímico do solo. Através da metaproteômica conseguimos obter respostas metabólicas específicas dos organismos do solo de acordo com o status de reabilitação da área. Desse modo, consideramos que a metaproteômica seja uma ferramenta útil ao monitoramento ambiental de áreas em reabilitação.

Palavras-chave: recuperação de áreas degradadas; bioquímica do solo; espectrometria de massas; monitoramento ambiental; microbiologia do solo

3.1 Introdução

Apesar dos benefícios econômicos e sociais, a mineração pode alterar drasticamente a paisagem, tendo em vista a completa supressão da vegetação, remoção das camadas de topsoil e eventuais contaminações do solo por resíduos tóxicos (LOSFELD et al., 2015). Leis ambientais no Brasil requerem medidas de compensação para impactos na biodiversidade e nos recursos naturais (GASTAUER et al., 2018a). Diante da complexidade do processo de reabilitação de áreas mineradas, a metaproteômica pode ser uma ferramenta útil no monitoramento ambiental dessas áreas (GASTAUER et al., 2018b), auxiliando na avaliação da recuperação da comunidade microbiana do solo, que é uma etapa crucial na recuperação de solos degradados (LI et al., 2014).

A metaproteômica descreve o perfil de proteínas identificadas de organismos presentes no solo (BISWAS; SARKAR, 2018). Uma vez que as proteínas são moléculas responsáveis por atividades funcionais em um organismo, diversas informações podem ser acessadas sobre vias metabólicas, mecanismos de defesa, energia metabólica e interações microrganismos-planta (BASTIDA; JEHLICH, 2016; MATTAROZZI et al., 2017).

A recuperação de uma área minerada é bem-sucedida quando ecossistemas saudáveis e autossustentáveis se desenvolvem em áreas anteriormente mineradas (GARRIS et al., 2016). O sucesso da reabilitação ambiental de uma área degradada por mineração pode ser avaliado pela comparação entre diferentes estágios de reabilitação com a utilização de áreas nativas como referência. Entretanto, estágios intermediários da reabilitação podem ser considerados como referências internas, uma vez que áreas nativas têm condições de desenvolvimento mais favoráveis e são ecologicamente mais maduras do que sistemas reabilitados (VICKERS; GILLESPIE; GRAVINA, 2012).

É discutido em Gastauer et al. (2018b) a influência de filtros ambientais e interações interespecíficas em comunidades em sucessão ecológica, a importância da biodiversidade para maior resiliência e resistência a perturbações e as estratégias adotadas na reabilitação de áreas degradadas. Entre essas estratégias, o uso de topsoil pode ser utilizado em projeto de RAD para promover aumento do conteúdo MOS e melhoria do status nutricional do solo, aumentar a biodiversidade em área de RAD, acelerar a sucessão vegetal nessas áreas e frequentemente melhorar a estrutura do solo (BORUVKA et al., 2012; RIBEIRO et al., 2018).

Embora não tenhamos conhecimento sobre nenhum trabalho de metaproteômica de solo realizado em áreas em recuperação, com o intuito de gerar dados de monitoramento ambiental, é possível observar em Bastida, Hernandez e García (2014) e Malik et al. (2018) acúmulo diferencial de proteínas e processos sendo relacionados a gradientes de MOS,

nutrientes e cobertura vegetal, por exemplo. Nesse sentido, este trabalho é uma tentativa inédita de identificar e monitorar proteínas e processos executados pelas mesmas, como respostas metabólicas de organismos do solo aos gradientes ambientais encontrados nos distintos status de reabilitação.

Consideramos que variáveis ambientais representativas de reabilitação observadas neste trabalho, *i.e.*, Temperatura do Solo, Índice de Área Foliar, MOS, possam impactar em respostas metabólicas nos organismos do solo. O Índice de Área Foliar influencia no microclima dentro da fitofisionomia, na interceptação da radiação, na troca de água e gás carbônico, sendo portanto um componente chave nos ciclos biogeoquímicos (BREDA, 2003). A temperatura do solo em áreas tropicais e subtropicais pode ser um grande problema para a produção de culturas e colonização microbiana (GROVER et al., 2011). Ainda em Grover et al. (2011) é interessante notar que os mecanismos de resposta de plantas e microrganismos ao aumento de temperatura são proteínas bem representadas no Capítulo 1 como chaperonas e chaperoninas, também encontradas na metaproteômica de RAD. A MOS é um fator ambiental central na metaproteômica de solos, influenciando no perfil de proteínas identificadas (BASTIDA; HERNANDEZ; GARCÍA, 2014; STARKE; JEHLICH; BASTIDA, 2018) e na quantidade de proteínas recuperadas do solo (STARKE; JEHLICH; BASTIDA, 2018).

O objetivo deste trabalho é demonstrar a utilização da metaproteômica como ferramenta auxiliar no monitoramento ambiental de áreas em reabilitação, anteriormente minas de extração de areia, utilizando uma área nativa como referência. Nossas hipóteses são que (i) as proteínas identificadas em cada área permitirão observar o status metabólico de organismos do solo; (ii) que poderemos relacionar as diferentes funções, classes de proteínas encontradas em cada área ao seu status de reabilitação; (iii) quanto mais avançado o estágio de recuperação maior o grau de similaridade taxonômica e funcional com áreas nativas.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Local de coleta e amostragem

As amostragens foram conduzidas em áreas de RAD e nas matas nativas que circundam a mineração de ferro, na Floresta Nacional (FLONA) de Carajás, em Parauapebas – PA, Brasil. O clima da região é tropical quente, com estação seca entre junho e setembro. Os tipos de solos mais abundantes são Latossolos, Cambissolos e Argissolos, com predomínio de Floresta Ombrófila Aberta e Floresta Ombrófila Densa (IBGE, 2012).

Os Arenitos, situados entre a Mina de Manganês e as minas do Complexo Vale Ferrosos Carajás, representam três cavas de extração de areia, que após o fim da exploração

foram preenchidas com estéril da Mina de Granito, situada ao Sul dos Arenitos. Após preenchimento das cavas, as áreas foram aplainadas; para sua revegetação foram utilizados topsoil, plantio de mudas e semeadura de espécies nativas (RELATÓRIO INTERNO DA VALE, 2018). Foi removida uma camada de 50 cm de topsoil (incluindo a camada orgânica e liteira) de área coberta por floresta densa, similar à referência da reabilitação. Depois da supressão da vegetação, para evitar degradação do topsoil aplicado, 30 cm deste foi de imediato homogeneamente distribuído com trator de esteira. O topsoil possuiu baixo conteúdo de nutrientes, especialmente P, Ca, e Mg, e necessitou de correção para otimizar o crescimento de plantas (GASTAUER et al., 2019, no prelo).

As áreas em estudo do Arenito 2 (figura 4) estão aproximadamente localizadas a 6°2'0''S e 50°14'0''O. A amostragem dos solos foi realizada na profundidade de 0-10 cm em três parcelas de 10 x 20 m, totalizando três amostras (três repetições) para cada área. Para a análise metaproteômica, as amostras das três parcelas foram homogeneizadas compondo uma amostra composta por ambiente, que foi analisada em triplicata. A coleta foi feita em período chuvoso em abril de 2018.

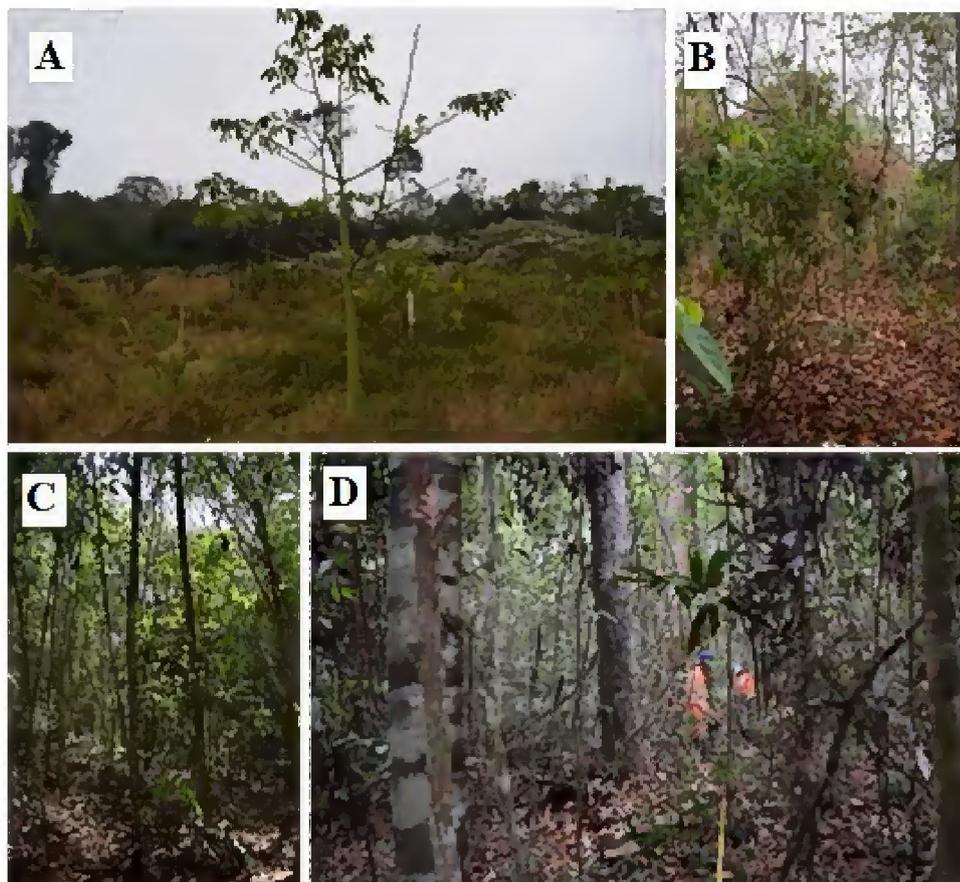


Figura 4. a) Aspecto geral das áreas de RAD e área nativa amostradas no Arenito 2. (A) RI com aproximadamente quatro anos de revegetação, representando estágio inicial; (B) RA12, representando estágio

avanzado de 12 anos de revegetação; (C) RA14, enriquecido com arbustos de jaborandi, representando estágio avanzado de 14 anos de revegetação; (D) SN: solo de floresta nativa (floresta ombrófila densa) como área de referência. Fonte: relatório interno da Vale (2018).

A MOS foi medida pelo método dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$). O índice de área foliar (IAF) foi calculado como uma medida indireta do fechamento do dossel em cada parcela dos locais de reabilitação e referência. Para fazer isso foi utilizado um LAI-2200C (LI-COR INC., Lincoln, NE, USA) seguindo as instruções do fabricante, em que as leituras acima do dossel (condições do céu) foram medidas continuamente por um sensor em um local livre de vegetação; um segundo sensor foi usado para capturar duas leituras abaixo do dossel em cada canto e no centro de cada parcela, i.e., 10 leituras abaixo do dossel para cada parcela. As leituras abaixo do dossel foram realizadas um metro acima da superfície do solo. A temperatura do solo foi medida com o sistema LI-6400 (LI-COR Inc.). Valores médios das variáveis ambientais representativas de reabilitação estão apresentadas na tabela 3.

Tabela 3. Valores médios de variáveis ambientais analisadas neste trabalho referentes a cada status de reabilitação.

Área	MOS (%)	IAF	Tsolo (°C)
SE	0,83	0,27	30,16
RI	1,1	0,58	23,42
RA12	2,34	3,11	24,07
RA14	1,92	4,65	22,42
SN	2,45	5,51	23,06

MOS: Matéria Orgânica do Solo; IAF: Índice de Área Foliar; Tsolo: Temperatura do Solo.

3.2.2 Extração e quantificação de proteínas

O isolamento de proteínas foi realizado com algumas modificações no protocolo de Wang et al. (2006), com as etapas de bancada detalhadas no Apêndice B. Cada amostra composta representou um diferente nível de RAD do Arenito 2 e uma área nativa como referência. As amostras foram mantidas por 10 minutos em temperatura ambiente até serem sonicadas por aproximadamente 30 segundos, 5 vezes. Os extratos foram divididos em oito microtubos cada, e adicionado 700 μ L de fenol por microtubo. As amostras foram vortexadas por 15 segundos e centrifugadas por sete minutos a 14.000 rpm para separação da fase fenólica, que foi transferida, sendo as amostras novamente centrifugadas a 14.000 rpm por sete minutos para eliminar qualquer resíduo da fase aquosa ou de SDS. Foram adicionados 700 μ L de acetato de amônia em metanol para a precipitação das proteínas por aproximadamente 24 horas à -80 °C. Uma nova centrifugação foi realizada a 14.000 rpm por

sete minutos, sendo posteriormente descartado o sobrenadante. O precipitado foi transferido para um novo microtubo e foi limpo por três vezes com acetona 80%. Uma última limpeza foi realizada com etanol 70% e o precipitado foi seco à temperatura ambiente em concentrador à vácuo por aproximadamente sete minutos. Os extratos foram solubilizados em 50 μL de rapigest a 0,2%. A quantificação de proteínas foi realizada no Qubit 2.0 (Invitrogen).

3.2.3 Digestão de proteínas e tratamento das amostras

Cinquenta microgramas de proteínas foram utilizados por amostra, e estas foram completadas com rapigest (Waters, Millford) a 0,1% para um volume final de 100 μL . A preparação da digestão envolveu a redução de proteínas com ditioneitol (DTT, 5 mM) e incubação por 25 minutos a 56 °C, seguida da alquilação com iodoacetamida (IAA, 14 mM) por 30 minutos a temperatura ambiente. Iodoacetamida residual foi removida ao adicionar DTT (5 mM) e incubar por 15 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram diluídas em 1:5 com bicarbonato de amônio, seguidas da adição de CaCl_2 (1 mM) e tratamento com tripsina (20 ng/ μL) por 16 horas a 37 °C. Subsequentemente, ácido trifluoroacético foi adicionado para uma concentração final de 0.4% para parar a reação enzimática.

Após as amostras ficarem incubadas a 37 °C por 90 minutos, estas foram então centrifugadas a 14000 rpm, 6 °C por 30 minutos. Feito isto, as amostras foram secas em concentrador a vácuo e ressuspendidas em 50 μL de formiato de amônio (10 mM) e então injetadas no cromatógrafo líquido 2D de ultra performance acoplado ao espectrômetro de massas (2D-UPLC-MS). Um sistema nanoACQUITY UPLC (Waters, Millford MA) foi configurado para um fracionamento 2D. Na primeira dimensão, uma coluna analítica XBridge BEH130 C18 (5 μm , 300 μm x 50 mm) foi utilizada em um fluxo de 2 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, e na segunda dimensão, uma coluna *trap* C18 (5 μm , 180 μm x 20 mm), acoplada com uma coluna analítica BEH130 C18 (1.7 μm , 100 μm x 100 mm), foi usada a um fluxo de 400 nL $\cdot\text{min}^{-1}$. Para este experimento nós utilizamos um método de fracionamento das amostras em 5 etapas usando um gradiente de 10.8%, 14.0%, 16.7%, 20.4%, e 65.0% de acetonitrila. A cromatografia foi acoplada diretamente a um espectrômetro de massa ESI-Q-ToF Synapt G2S (Waters), configurado para operar em modo positivo com fragmentação contínua (MS^E), com a energia de colisão variando de 5 a 40 eV.

3.2.4 Bioinformática

Os dados brutos foram processados utilizando Proteinlynx Global Server 3.0.2. (PLGS). As buscas foram também realizadas no PLGS contra uma base de dados do

UniprotKB composta por sequências de Bactérias, Plantas e Fungos (Bactéria: 336 171 sequências; Plantas: 6 347 e Fungos: 33 362). Carbamidometilação no C-terminal (+57) foi definido como modificação fixa e modificações variáveis foram definidas como a seguir: -1Da em (Amidação+C-Terminal), +1Da em N (Desaminado), +16Da em M (Oxidação), +80Da em (Fosforil+STY), +98Da em STY (Fosforil STY). A tolerância do íon fragmentado e do íon parental foi definida como automático e a Taxa de Falsa Descoberta (FDR) foi calculada pelos algoritmos PeptideProphet e ProteinProphet (Nesvizhskii et al., 2003). Peptídeos foram aceitos quando FDR calculada foi menor do que 6.6% e proteínas menor do que 3.3%.

A anotação funcional das proteínas foi realizada utilizando o software OmicsBox versão 1.1.0 (Biobam) usando os parâmetros padrão. A análise GO-slim foi aplicada. As representações taxonômicas quanto a abundância de peptídeos foram construídas utilizando o método Menor Ancestral Comum (LCA – Lowest Common Ancestor) baseado na lista de peptídeos identificados, usando a ferramenta de busca online Unipect (<https://unipept.ugent.be/>) (MESUERE et al., 2015).

3.2.5 Análise estatística

Para verificar diferenças significativas da quantidade de proteínas identificadas entre as amostras, foi realizada a one-way ANOVA seguida pelo teste post-hoc de tukey com $p < 0,05$, através da ferramenta encontrada em <http://statpages.info/anova1sm.html>. Os diagramas de Venn foram construídos por meio da ferramenta obtida em <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>. Para realizar o agrupamento das amostras, a partir da abundância de peptídeos entre os filos bacterianos, foi utilizado o Método de Associação Média (UPGMA, em inglês), utilizando a distância euclidiana. Através do software Past 3 foi feita a análise de correlação utilizando-se o coeficiente de correlação de Pearson. Com a ferramenta online Clustvis (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>) foi realizada a análise de componentes principais (PCA), com o método de decomposição em valores singulares (SVD). O software Xlstat foi utilizado para fazer o agrupamento hierárquico aglomerativo, com distância euclidiana.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Visão geral das proteínas identificadas

O número de proteínas identificadas por área (Figura 5) mostra maior quantidade de proteínas para RI (336), RA12 (329), RA14 (216) e SN (291) se comparado com SE (40).

Embora RA14 tenha um menor valor de proteínas identificadas se comparado a RI e RA12, este não difere significativamente de SN, e SN não difere significativamente das áreas em reabilitação ($p < 0,05$). Isto mostra o efeito positivo da reabilitação das áreas mineradas para a recuperação de proteínas do solo, já que estas áreas em número de proteínas do solo se distinguem significativamente da condição degradada do SE.

Tais resultados podem indicar a influência do topsoil de área nativa (transferido para as áreas em reabilitação no início da revegetação) para a alta quantidade de proteínas identificadas na amostra RI. O topsoil contém maior teor de MOS que camadas mais profundas do solo (TIAN et al., 2016), contém também banco de sementes, rizomas, raízes e outros componentes vegetais (FERREIRA et al., 2015). As propriedades do topsoil ainda influenciam positivamente a população e atividade microbiana (BHATTARAI; BHATTARAI; PANDEY, 2015; STRUECKER; JOERGENSEN, 2015; TIAN et al., 2016).

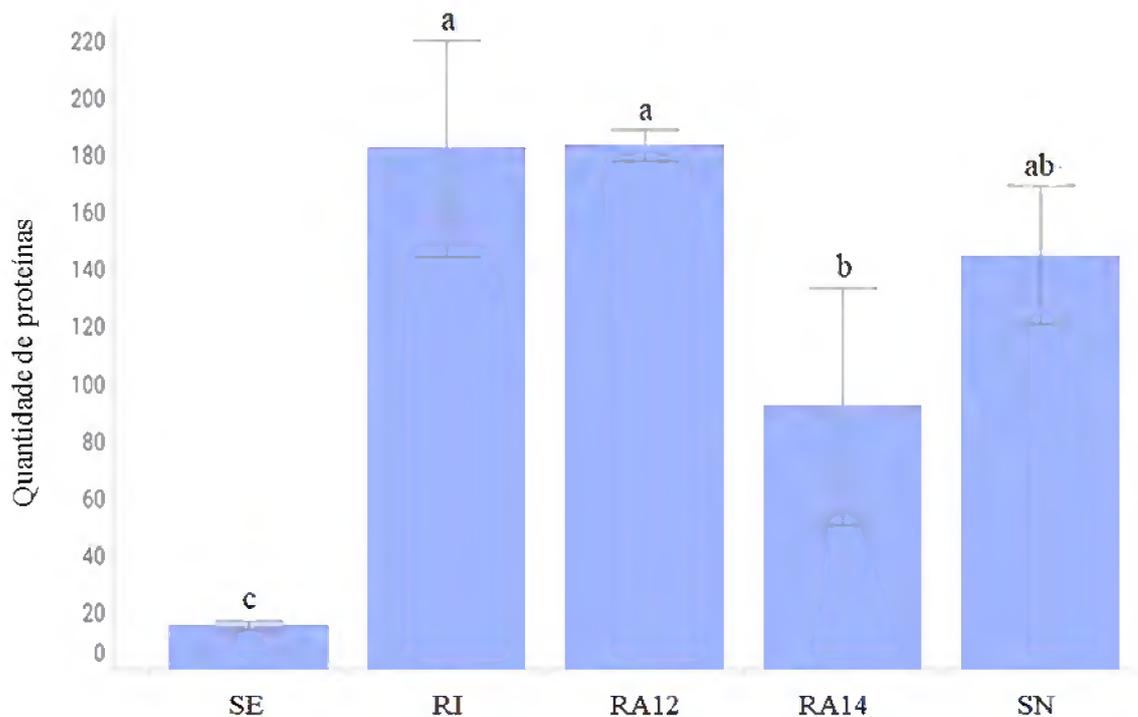


Figura 5. Quantidade de proteínas identificadas por área. As barras mostram o valor médio de proteínas identificado por área. Dados seguidos da mesma letra não diferem significativamente de acordo com o Teste de Tukey ($p < 0,05$).

A quantidade de proteínas identificadas sofre efeito tanto das propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (BASTIDA et al., 2009; MANDALAKIS et al., 2018) como do método de extração (KEIBLINGER et al., 2012). Portanto, para descrever as atividades metabólicas da comunidade microbiana e vegetal e assim verificar semelhanças funcionais entre as áreas, o perfil individual de cada proteína (*i.e.* nome, função) e categorias funcionais

(e.g categorização funcional GO, classificação enzimática EC) devem ser levados em consideração.

Um total de 49% de proteínas foram assinaladas a bactérias, 15% a fungos e 36% a plantas. Considerando que foram evitados pedaços de folhas e raízes na amostragem do solo, e que entre fungos e bactérias a abundância de peptídeos foi maior para bactérias, nós entraremos em maiores detalhes sobre a classificação taxonômica nestes últimos.

3.3.2 Diversidade baseada em peptídeos e abundância de grupos bacterianos ao longo da reabilitação

A análise metaproteômica através do Unipept permite, entre outras funcionalidades, observar a classificação taxonômica dos peptídeos identificados e a abundância de peptídeos para cada grupo taxonômico (MESUERE et al., 2015). Em relação a peptídeos de bactérias, 14 filios foram identificados (Figura 6). Merecem destaque os filios Proteobactéria e Firmicutes que são representados em todas as áreas, sendo Proteobactéria o mais representativo dos filios, a exceção do SE, no qual Firmicutes tem maior número de peptídeos identificados.

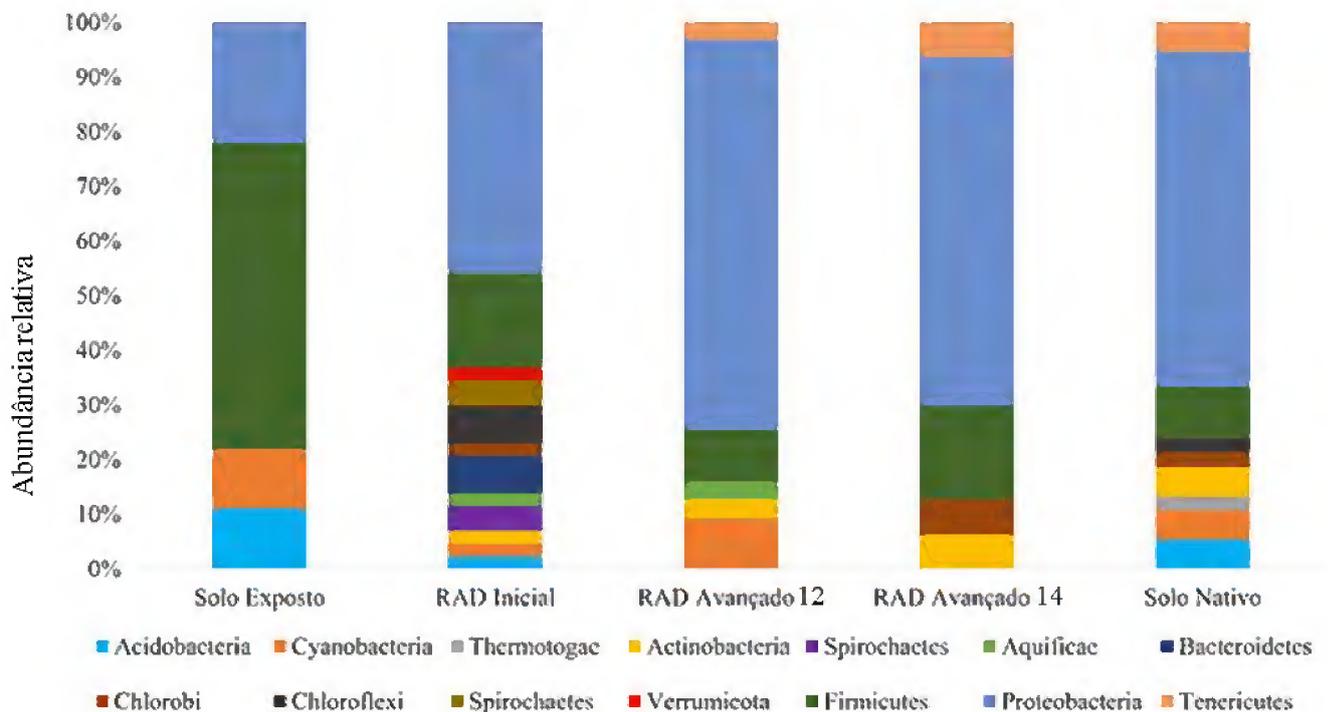


Figura 6. Abundância relativa de peptídeos entre filios bacterianos. Construído através dos resultados obtidos do software Unipept.

Outro dado interessante é que além dos filios bacterianos citados, Chlorobi, Tenericutes e Actinobacteria completam os filios identificados em RA14, os quais são também encontrados na área de referência. Em Sun et al. (2018) foi verificada maior predominância

do filo Chlorobi em rejeitos da mineração de cobre revegetados, do que no rejeito não recuperado. Tenericutes foi detectado apenas em florestas e campos nativos se comparados a diferentes áreas em recuperação de mineração de carvão, no Sul brasileiro (QUADROS et al., 2015). Bactérias do filo Actinobacteria são mediadores importantes na degradação de lignina e na formação de húmus (EISENLORD; ZAK, 2010). Desse modo, sugere-se a importância desses filios na recuperação da microbiota dos solos em reabilitação.

O agrupamento baseado na abundância relativa de peptídeos (Figura 7) mostra maiores semelhanças de filios bacterianos entre os solos das áreas RA14 e RA12 com o SN (referência), indicando que a população de bactérias metabolicamente ativas tem sido recuperada. Quanto ao número de filios bacterianos identificados RI>SN>RA12>RA14>SE.

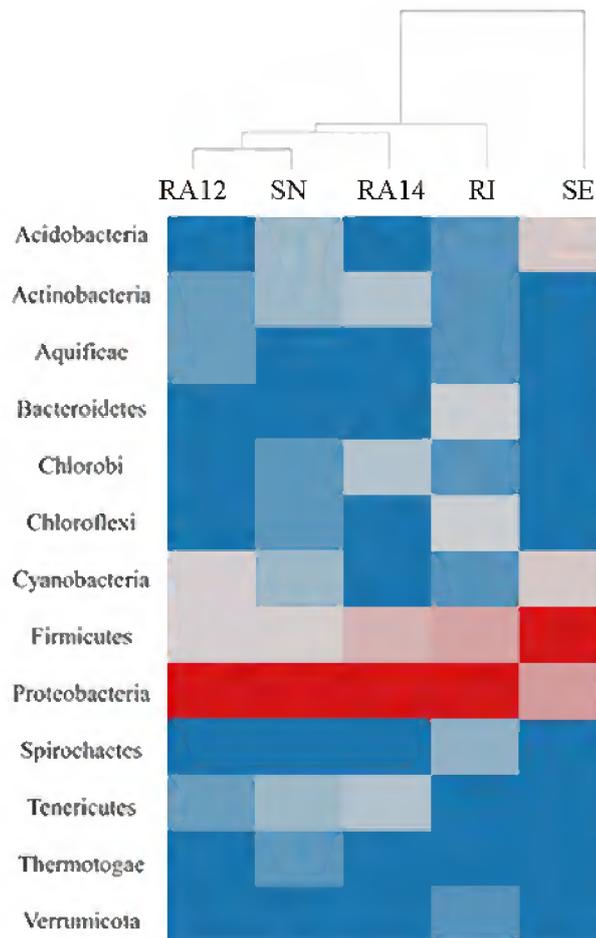


Figura 7. Heatmap e agrupamento das áreas a partir da abundância de peptídeos entre os filios bacterianos. Quanto mais vermelha a caixa maior é a abundância, caixa branca significa abundância intermediária e quanto mais azul a caixa menor a abundância de peptídeos.

Nós atribuímos a maior diversidade de filios bacterianos em RI à aplicação de topsoil. É provável que os inóculos advindos do topsoil tenham sido estimulados, dando origem a uma maior diversidade filogenética no início da reabilitação. Todavia, ao longo da reabilitação (de

RI para RA14), parte da população microbiana deve ter sido selecionada em favor de filos mais adaptados às condições locais, buscando a estabilidade do sistema. A sucessão ecológica nesta comunidade pode ser afetada pela disponibilidade de recursos, pela habilidade das populações microbianas em utilizar estes recursos e pela competição microbiana (FIERER, et al., 2010; MENDES et al., 2015).

Era esperado o menor número de filos bacterianos em SE tendo em vista o impacto da mineração na estrutura do solo (RIBEIRO et al., 2018), assim o ambiente altamente degradado seleciona organismos adaptados a uma condição estressante (GASTAUER et al., 2018b) e limitada em MOS, nutrientes no solo (BANNING et al., 2011; RIBEIRO et al., 2018). Dessa forma, a presença do filo Cyanobacteria é essencial para a incorporação de C no solo, através da fotossíntese bacteriana (ISSA et al., 2007), possuindo papel crucial no início da sucessão em comunidades microbianas do solo (BARDGETT; PUTTEN, 2014). Além disso, o filo mais representativo em abundância de peptídeos em SE foi Firmicutes (56%), o qual em Rodrigues et al. (2013) e Mendes et al. (2015) verificou-se ter a abundância relativa maior em áreas de pasto se comparadas as de floresta. Estes autores discutem a resistência de Firmicutes à dissecação e à variações ambientais extremas, esta característica pode auxiliar bactérias deste filo a sobreviverem a variações de temperatura do solo durante o dia no SE, sem cobertura vegetal.

A exceção do SE, o filo Proteobacteria é o mais representativo das áreas. Mendes et al. (2015) destacam a maior abundância deste filo em áreas florestadas e a sua importância para o ciclo do carbono, nitrogênio e enxofre. Nesse sentido, dentro desse filo destacamos a presença de bactérias da ordem Rhizobiales (Apêndice C – Figura S1), reconhecida por conter bactérias fixadoras de nitrogênio (JONES, 2015), em todas as áreas a exceção de SE.

De acordo com Banning et al. (2011), ao longo da recuperação de áreas mineradas, foi observado a tendência de aumento na abundância de bactérias pertencentes ao filo Proteobacteria e redução na abundância de Firmicutes, uma tendência semelhante foi observada em nosso trabalho de SE até RA12. Ademais, Sun et al. (2018) verificaram predominância de Firmicutes em área de rejeito de cobre não recuperado, comparado a áreas com este rejeito revegetadas, onde foi observado maior abundância do filo Proteobacteria.

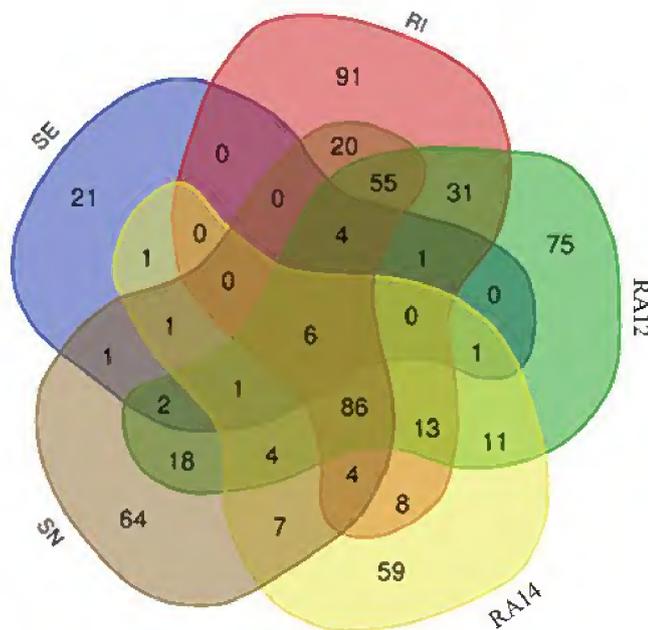
3.3.3 Informações funcionais através da metaproteômica ao longo da recuperação

Nós procuramos por diferentes respostas metabólicas dos organismos ao ambiente, ajudando a esclarecer como plantas, fungos e bactérias se adaptam as distintas condições das áreas em estudo, que vão de maior nível de degradação do SE ao solo melhor estruturado SN.

A partir da categorização funcional de proteínas, podemos agrupar proteínas identificadas em processos biológicos referentes ao Gene Ontology, por exemplo. Esta categoria funcional faz parte do primeiro nível de ontologia na hierarquia de classificação GO (<http://geneontology.org/docs/ontology-documentation/>).

A categoria GO de processos biológicos se refere a um objetivo biológico no qual produtos gênicos contribuem (ASHBURNER et al., 2000), neste trabalho estes produtos gênicos são proteínas. Esta classificação se torna útil para a metaproteômica de solos, considerando a heterogeneidade do solo e a complexidade das informações que derivam da identificação de proteínas. Por exemplo, a proteína B do sistema UvrABC é encontrada em RI, mas não em RA12, enquanto a proteína protease Lon é encontrada em RA12 mas não em RI. A categorização funcional em processo biológico descreve a função de ambas proteínas como “resposta ao estresse” (GO: 0006950), fazendo com que a análise funcional não dependa da observação individual de determinada proteína em cada solo (e em cada réplica). Nesse sentido, podemos observar as semelhanças entre as áreas a partir das 585 proteínas únicas identificadas e a partir dos processos biológicos que estas representam (Figura 8).

a)



b)

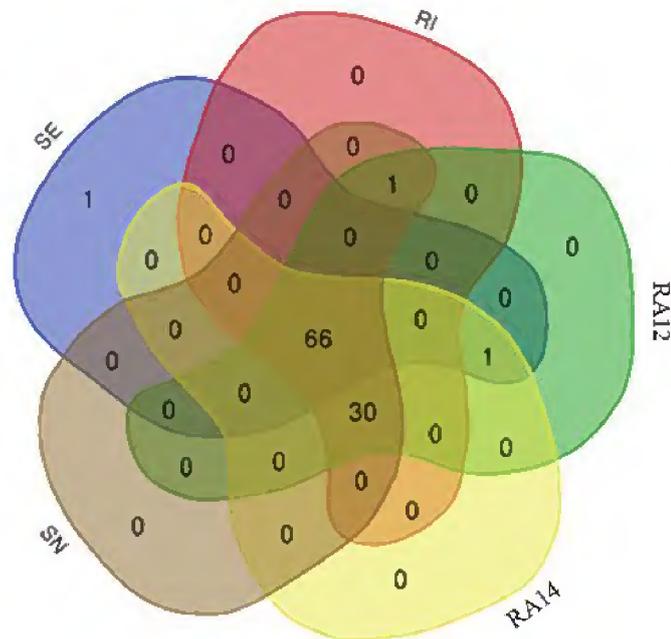


Figura 8. (a) Diagrama de Venn representando o número de proteínas identificadas por área (b). Diagrama de Venn apresentando o número processos biológicos (níveis 2, 3 e 4) identificados por área.

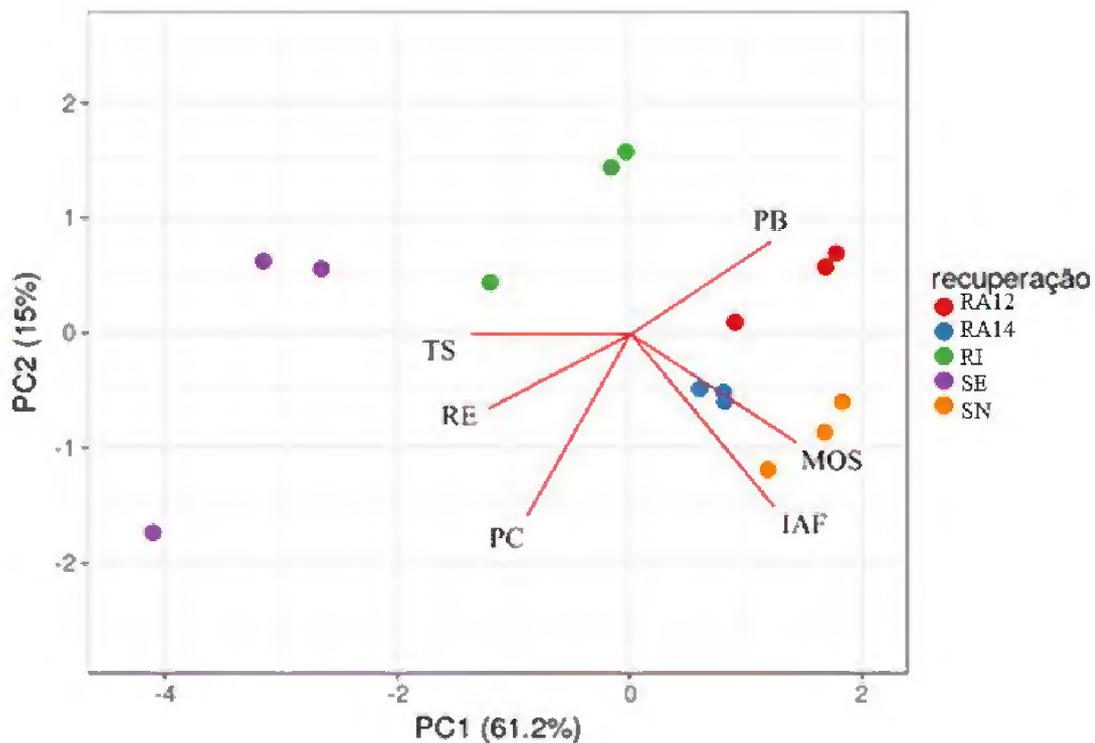
Ao se observar as proteínas comuns entre as áreas e únicas de cada área, um elevado número de proteínas identificadas é exclusivo de cada área. Porém, quando observamos essas proteínas categorizadas em processos biológicos, esta heterogeneidade de componentes é reduzida. Assim, percebemos que, apesar de grande parte das proteínas não coincidirem entre as áreas a maioria dos processos biológicos são compartilhados entre todas as áreas, e que 30 processos biológicos são comuns aos solos de áreas de RAD e Nativo (lista dos processos em Apêndice C – Tabela S1).

O único processo exclusivo considerando as 5 áreas, foi o de “fotossíntese” (GO:0015979) mapeado nas amostras de SE, representado pela proteína P700 fotossistema 1 da cianobactéria *Nostoc sp.* Esta proteína realiza a doação primária de elétrons no fotossistema 1 (GOLBECK, 1994). Levando em conta em SE a alta exposição do solo à luz solar e o baixo teor de MOS, é fundamental para a incorporação de C no solo a presença do processo de fotossíntese microbiano. Este pode ser um mecanismo de adaptação às restrições ambientais encontradas em solo minerado (GASTAUER, 2018b). Ainda, é reconhecido o desenvolvimento de cianobactérias no início da sucessão microbiana em solo (BARDGETT; PUTTEN, 2014).

Considerando processos comuns às 5 áreas em estudo, chamamos atenção para processos como “processo de catabolismo” (GO: 0009056), “processo de biossíntese” (GO: 0009058) e “resposta ao estresse” (GO: 0006950) (Quantidade de proteínas em cada processo em Apêndice C – Tabela S2), estes processos já foram relatados em trabalhos de metaproteômica de solos (BASTIDA; HERNÁNDEZ; GARCÍA, 2014; MATAROZZI et al., 2017; ZAMPIERI et al., 2016) e através destes podemos verificar como os organismos respondem metabolicamente aos diferentes níveis de reabilitação.

Para se observar relações entre os três processos biológicos acima destacados e variáveis ambientais representativas de reabilitação, realizamos a análise de componentes principais (Figura 9).

a)



b)

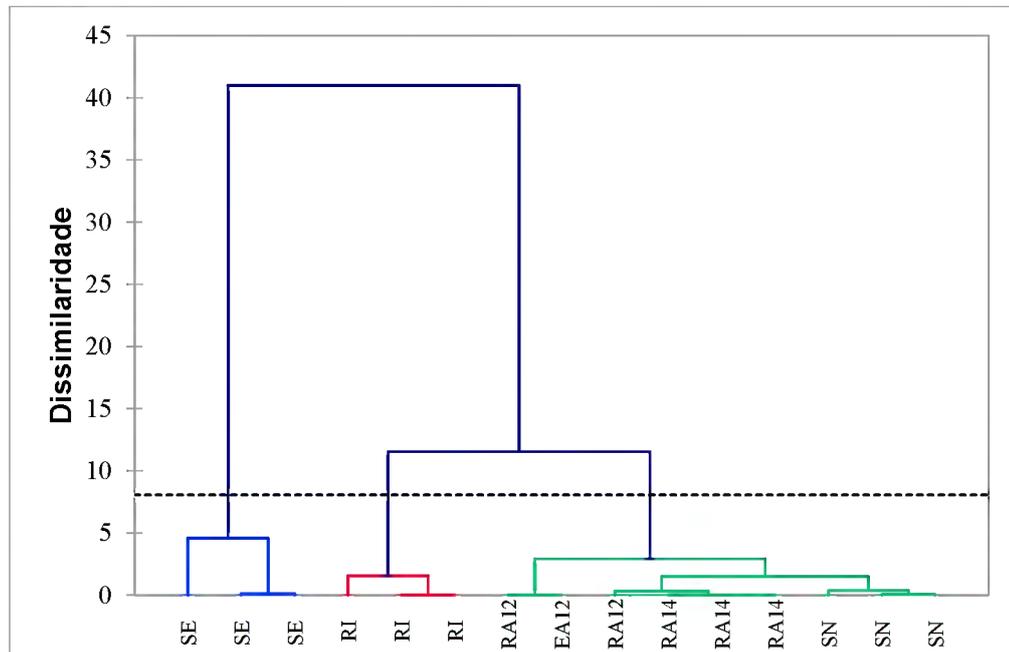


Figura 9. Análise de componentes principais (PCA) realizada a partir dos valores normalizados de variáveis ambientais e de quantidade de proteínas nos processos citados. Feito com a ferramenta online ClustVis (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>). Os eixos X e Y mostram o componente principal 1 e 2, que explicam 61,2% e 15% da variância, respectivamente. a) Plot. Os vetores mostram os “Loadings”, que indicam a correlação de cada variável com a PC1 e PC2 (ver também apêndice C – figura S2). TS: temperatura do solo; RE: resposta ao estresse (GO: 0006950); PC: processo de catabolismo (GO: 0009056); PB: processo de biossíntese (GO: 0009058); MOS: matéria orgânica do solo; IAF: índice de área foliar. b) Agrupamento hierárquico aglomerativo realizado a partir dos escores de cada amostra em PC1 e PC2.

A PCA mostra a ordenação das amostras entre o PC1 e PC2, assim é possível observar que as amostras são separadas sobretudo ao longo do eixo PC1, que colabora com 61,2% da variância das observáveis analisadas. Verificamos também maiores semelhanças entre as áreas RA12, RA14 e SN do que RI, mais dissimilar ainda é SE. O agrupamento realizado com os escores individuais da PC1 e PC2 de cada amostra ratifica esta afirmação.

Enquanto MOS, IAF e processo de biossíntese estão positivamente correlacionados à PC1, Tsolo, resposta ao estresse e processo de catabolismo estão negativamente correlacionados nesta componente.

É reconhecida a capacidade de plantas (NADAL et al., 2011; ATKINSON; URWIN, 2012) e microrganismos (LOPÉZ-MAURY et al., 2008) em regular seus metabolismos para se adaptarem a condições adversas. Assim, ordenações semelhantes da temperatura do solo e resposta ao estresse ao longo da PC1 sugere que maiores temperaturas do solo nos estágios iniciais de recuperação e no solo exposto (com menor cobertura vegetal) tenha relação com maiores quantidades de produtos gênicos agrupados em resposta ao estresse (SCHIMEL et al., 2007; NADAL et al., 2011).

A categoria GO de resposta ao estresse (GO: 0006950) é definida como qualquer processo que resulta em mudança no estado ou atividade de uma célula ou organismo (em termos de expressão gênica, produção de enzimas etc.) como resultado de uma perturbação usualmente exógena (*e.g.* temperatura, umidade, radiação ionizante) (ASHBURNER et al., 2000; THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM, 2019). Chaperoninas são exemplo de proteínas identificadas em nosso trabalho que são relacionadas a resposta ao estresse. Estas moléculas previnem o dobramento incorreto de proteínas e promovem o redobramento e montagem apropriada de polipeptídeos sob condições de estresse (KERNER et al., 2005; HARUTA; KANNO, 2015). Outro exemplo de proteína deste processo é a Ruvb-like helicase 1, envolvida na reparação da molécula de DNA (DUJON, et al., 2004).

A categoria GO de processo de catabolismo (GO: 0009056) é definida como as reações químicas e vias que resultam na quebra de substâncias, incluindo a quebra de compostos de carbono com a liberação de energia para uso da célula ou organismo (ASHBURNER et al., 2000; THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM, 2019). A análise PCA mostra uma relação inversa entre este processo e o de biossíntese. Geyer et al. (2016) discutem o catabolismo celular e seu papel em processos desassimilativos, estes processos ocorrem preferencialmente quando a demanda energética é alta ou a limitação de energia existe, ademais células com limitação nutricional também direcionam recursos à desassimilação. Exemplos de proteínas desta categoria GO identificada em nosso trabalho foram as proteínas ATG, as quais participam da autofagia. De acordo com Wesselborg e Stock (2015) diferentes condições de estresse podem causar a indução ativa da maquinaria autofágica, realizando a degradação de agregados proteicos ou organelas danificadas, garantindo assim a homeostase celular. Estas condições de estresse incluem hipóxia, privação de nutrientes ou infecção patogênica.

Já o processo de biossíntese (GO: 0009058) é definido como as reações químicas e vias resultando na formação de substâncias; tipicamente a parte do metabolismo que exige energia, na qual substâncias mais simples são transformadas em substâncias mais complexas (ASHBURNER et al., 2000; THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM, 2019). Exemplos de proteínas deste processo encontradas em nosso trabalho foram proteínas ribossomais das regiões 30s e 50s, responsáveis por constituírem os ribossomos e, portanto, participarem da tradução (WINBERLY et al., 2000; YAMAGUCHI e SUBRAMANIAN, 2000). Bastida, Hernandez e García (2014) realizaram a metaproteômica em três diferentes tipos de solo em um ambiente semiárido, dentre os três o solo de floresta apresentou maior nível de processos de biossíntese, enquanto que os outros dois solos, com menor teor de MOS e menor cobertura

vegetal, mostraram menores níveis de processos de biossíntese se comparados ao solo de floresta. Liang, Schimel e Jastrow (2017) ressaltam a importância de processos microbianos anabólicos (biossíntese) no depósito de C na MOS.

Podemos observar um balanço metabólico geral da população estudada a partir das proteínas identificadas nesses três importantes processos. Resposta ao estresse (GO: 0006950) é um processo inversamente relacionado ao processo de biossíntese (GO 0009058). De fato, a correlação entre o número de proteínas identificadas nestes dois processos mostra um valor negativo ($r = -0,58$, $p < 0,05$). Já entre processo de catabolismo (GO: 0009056) e resposta ao estresse (GO: 0006950) 54% das proteínas são comuns a ambos, indicando que pouco mais da metade das proteínas de processo de catabolismo identificadas em nosso trabalho são relacionadas a resposta ao estresse. De acordo com Malik et al. (2018) a biossíntese é reduzida em cenários de estresse e limitação de recurso, quando o investimento celular é maior em características focadas na tolerância ao estresse e aquisição de recursos.

É notável perceber maiores quantidades de proteínas relacionadas a resposta ao estresse (GO: 0006950) em SE e menores relacionadas ao processo de biossíntese (GO 0009058) nessa área (Apêndice C – Tabela S2). Isso mostra a atenuação das condições de estresse aos organismos do solo a partir de RI (4 anos), permitindo que estes direcionem seu metabolismo ao processo de biossíntese (GO 0009058), aumentando a habilidade dessas comunidades em armazenar carbono (MALIK et al., 2018). Assim, esses processos biológicos podem ser indicadores de recuperação da área, levando-se em conta a redução dos níveis de estresse dos organismos do solo e maior estabilidade da comunidade, objetivo da RAD (VICKERS; GILLESPIE; GRAVINA, 2012).

3.1.4 Hidrolases, oxidoredutases e transformações de nutrientes no solo

Hidrolases e oxidoredutases são as classes de enzimas mais estudadas ao se avaliar a transformação da MOS e processos de ciclagem de nutrientes (MIRALLES et al., 2012; BAUTISTA-CRUZ; ORTIZ-HERNÁNDEZ, 2015). O potencial de transformação de nutrientes ou de fontes de energia específicas pode ser acessado ao se examinar essas enzimas do solo (MIRALLES et al., 2012). Estas transformações da MOS possibilitam a assimilação de moléculas simples pelos microrganismos e pelas plantas através das raízes (ZAGO et al., 2016).

Exemplos de oxidoredutases e hidrolases identificadas em nosso trabalho relacionadas à transformação da MOS e ciclagem de nutrientes são apresentadas na tabela 4.

Tabela 4. Exemplos de oxidoredutases e hidrolases identificadas na metaproteômica de RAD. Tabela baseada em Bastida et al. (2014), Zago et al. (2016) e Adetunji et al. (2017).

Enzima (EC number)	Função	Área (s)
Oxidoredutases		
Fotossistema 1 (1.97.1.12)	Fixação de Carbono	SE
Nitrogenase (1.18.6.1)	Fixação de Nitrogênio	RI
Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (1.2.1.12)	Oxidação da MOS	RA12
Malato desidrogenase (1.1.1.40)	Oxidação da MOS	RA14
Isocitrato desidrogenase (1.1.1.42)	Oxidação da MOS	SN
Hidrolases		
Alfa – glicosidase (3.2.1.20)	Hidrólise de glicosídeos	RI
Celulase (3.2.1.4)	Hidrólise da celulose	RI, SN
Peptidases (3.4.-.-)	Hidrólise de peptídeos	RI, RA12, RA14, SN
Beta – glicosidase (3.2.1.21)	Hidrólise de glicosídeos	SN

É interessante observar a já citada proteína P700 fotossistema 1 apenas em SE, e a enzima nitrogenase apenas em RI. Estes achados podem estar relacionados aos reduzidos teores de carbono orgânico e nitrogênio no solo dessas áreas. De fato, SE possui o menor teor de CO dentre as áreas (0,48%) e RI o menor de nitrogênio (0,07%) (Tabela 5). A presença dessas proteínas indica uma adaptação ecológica ao fixar esses elementos (C e N) em resposta aos baixos teores desses nutrientes no SE e solo RI (BASTIDA; HERNANDEZ; GARCÍA, 2014).

Tabela 5. Teores de carbono orgânico e nitrogênio do solo. Dados seguidos da mesma letra não diferem significativamente de acordo com o Teste de Tukey ($p < 0,05$).

	SE	RI	RA12	RA14	SN
CO (%)	0,48±0,12 ^b	0,63±0,09 ^b	1,36±0,24 ^a	1,11±0,10 ^a	1,42±0,06 ^a
Nsolo (%)	0,09±0,03 ^b	0,07±0,01 ^b	0,18±0,02 ^a	0,15±0,01 ^a	0,23±0,01 ^a

Embora bastante reduzidos teores de MOS dos solos em nosso estudo (mesmo SN) se comparados a outras áreas da serra de Carajás (NUNES et al., 2015), foram encontradas importantes hidrolases associadas à hidrólise de celulose (3.2.1.4) e de glicosídeos (3.2.1.20 e 3.2.1.21). A primeira hidrolisa randomicamente a molécula de celulose, liberando

oligossacarídeos de diversos graus de polimerização, já as enzimas 3.2.1.20 e 3.2.1.21 quebram oligossacarídeos de baixa massa molecular para a produção de monossacarídeos, principal fonte de energia para os microrganismos do solo (CASTRO; JÚNIOR, 2010; ZAGO et al., 2016). Assim, podemos observar através das enzimas identificadas em RI e SN a transformação completa de celulose, composto orgânico que contém importante estoque de C necessário ao crescimento e sobrevivência dos microrganismos do solo (MAKOI; NDAKIDEMI, 2008).

As oxidoredutases 1.2.1.12, 1.1.1.40, 1.1.1.42 são espécies de desidrogenases, suas atividades catalíticas de oxidação da matéria orgânica ocorrem no interior celular participando de vias metabólicas. Ainda, desidrogenases têm sido utilizadas como um indicador geral de atividade microbiana em solos (BASTIDA; HERNÁNDEZ; GARCÍA, 2014). Peptidases (EC 3.4.-.-) têm importante papel na mineralização de nitrogênio no solo, ao tornar o nitrogênio contido nas proteínas disponível para plantas e microrganismos (BACH; MUNCH, 2000; VRANOVA; REJSEK; FORMANEK, 2013).

Foi verificado através da correlação de quantidade de oxidoredutases e redutases com as variáveis ambientais, correlações positivas com o teor de MOS e IAF e negativa para Tsolo (Apêndice C – Tabela S3). Assim, é possível observar como estas variáveis moleculares respondem a variáveis ambientais. Além disso, observações nessas duas classes de enzimas elucidam transformações chave em nutrientes essenciais como C e N, apontando como organismos do solo reciclam seus componentes orgânicos em um ambiente pobre em MOS.

3.4 Conclusão

Foram identificadas significativamente mais proteínas nas áreas de recuperação RI, RA12, RA14 e solo nativo do que no solo exposto. Isto mostra o efeito positivo da reabilitação das áreas mineradas para a recuperação dos processos bioquímicos do solo.

Foi endereçado a importância dos filos Cianobactéria e Firmicutes no SE, enquanto para as demais áreas verificou-se a predominância de Proteobactérias. Observou-se maior similaridade de grupos bacterianos entre as áreas avançadas e nativa, ademais os filos encontrados em RA14 são também encontrados em SN, sugerindo a importância destes na recuperação da comunidade de bactérias do solo.

Verificamos relações entre variáveis ambientais representativas de reabilitação e processos biológicos realizados por proteínas. Desse modo, observamos um balanço metabólico geral da população estudada, que responde ao status de reabilitação das áreas. Ainda, levando-se em conta as variáveis ambientais estudadas e processos biológicos

realizados por proteínas, foi possível verificar maiores semelhanças entre SN com RA12 e RA14 do que com RI e SE.

Identificamos importantes oxidoredutases e hidrolases envolvidas na transformação de nutrientes do solo. Notavelmente, encontramos enzimas responsáveis pela fixação de carbono em SE e de nitrogênio em RI, indicando uma adaptação ecológica dos microrganismos às pobres quantidades desses nutrientes nesses solos.

Consideramos que ao observar a diversidade e o metabolismo de organismos do solo, permitir relacionar as diferentes funções, classes de proteínas encontradas em cada área ao seu status de reabilitação, a metaproteômica seja uma ferramenta de grande valor para o monitoramento ambiental de áreas em recuperação.

3.5 Referências

ADETUNJI, A. T.; LEWU, F. B.; MULIDZI, R.; NCUBE, B. The biological activities of glucosidase, phosphatase and urease as soil quality indicators: a review. **Journal of soil science and plant nutrition**, v. 17, n. 3, p. 794–807, 2017. doi: 10.4067/S0718-95162017000300018

ASHBURNER et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. **Nat Genetics**, v. 25, p. 25-9, 2000. doi: 10.1038/75556

ATKINSON, N. J., URWIN, P. E. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 3523-3543, 2012. doi: 10.1093/jxb/ers100

BACH, H. J.; MUNCH, J. C. Identification of bacterial sources of soil peptidases. **Biology and Fertility of Soils**, v. 31, p. 219–224, 2000. doi: 10.1007/s003740050648

BANNING, N. C.; GLEESON, D. B.; GRIGG, A. H.; GRANT, C. D.; ANDERSEN, G. L.; BRODIE, E. L.; MURPHY, D. V. Soil Microbial Community Successional Patterns during Forest Ecosystem Restoration. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 17, p. 6158–6164, 2011. doi: 10.1128/AEM.00764-11

BARDGETT, R. D., PUTTEN, W. H. Belowground biodiversity and ecosystem functioning. **Nature**, v. 515, p. 505-511, 2014. doi: 10.1038/nature13855

BASTIDA, F.; HERNÁNDEZ, T., GARCÍA, C. Metaproteomics of soils from semiarid environment: Functional and phylogenetic information obtained with different protein extraction methods. **Journal of Proteomics**, v. 101, p. 31-42, 2014. doi: 10.1016/j.jprot.2014.02.006

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, p. 845-859, 2009. doi: 10.1111/j.1365-2389.2009.01184.x

BASTIDA, F.; N. JEHLICH. It's all about functionality: How can metaproteomics help us to discuss the attributes of ecological relevance in soil? **Journal of Proteomics**, v. 144, p. 159-161, 2016. doi: 10.1016/j.jprot.2016.06.002

BAUTISTA-CRUZ, A.; ORTIZ-HERNÁNDEZ, Y. D. Hydrolytic soil enzymes and their response to fertilization: A short review. **Comunicata Scientiae**, v. 6, n. 3, p. 255–262, 2015. doi: 10.14295/cs.v6i3.962

BHATTARAI, B. Variation of Soil Microbial Population in Different Soil Horizons. **Journal of Microbiology & Experimentation**, v. 2, n. 2, p. 2–5, 2015. doi: 10.15406/jmen.2015.02.00044

BISWAS R., SARKAR A. 'Omics' Tools in Soil Microbiology: The State of the Art. In: Adhya T., Lal B., Mohapatra B., Paul D., Das S. (eds) **Advances in Soil Microbiology: Recent Trends and Future Prospects**. Microorganisms for Sustainability, vol 3. Springer, Singapore. 2018. doi: 10.1007/978-981-10-6178-3

BORUVKA, L.; KOZÁK, J.; HLHANSELOVÁ, M.; DONATOVÁ, H.; NIKODEM, A.; NEMECEK, K.; DRÁBEK, O. Effect of covering with natural topsoil as a reclamation measure on brown-coal mining dumpsites. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 113, p. 118-123. 2012. doi: <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2011.11.004>

BRÉDA, N. J. J. Ground-based measurements of leaf area index: A review of methods, instruments and current controversies. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 392, p. 2403–2417, 2003. doi: 10.1093/jxb/erg263

CASTRO, A. M. DE; JUNIOR, N. P. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181–188, 2010.

DUJON, B. et al. Genome evolution in yeasts. **Nature**, v. 430, n. 6995, p. 35–44, 2004. doi: 10.1038/nature02579

EISENLORD, S. D.; ZAK, D. R. Simulated Atmospheric Nitrogen Deposition Alters Actinobacterial Community Composition in Forest Soils. **Soil Science Society of America Journal**, v. 74, n. 4, p. 1157, 2010. doi: 10.2136/sssaj2009.0240

FERREIRA, M. C.; WALTER, B. M. T.; VIEIRA, D. L. M. Topsoil translocation for Brazilian savanna restoration: Propagation of herbs, shrubs, and trees. **Restoration Ecology**, v. 23, n. 6, p. 723–728, 2015. doi: 10.1111/rec.12252

FIERER, N.; NEMERGUT, D.; KNIGHT, R.; CRAINE, J. M. Changes through time: Integrating microorganisms into the study of succession. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 8, p. 635–642, 2010. doi: 10.1016/j.resmic.2010.06.002

GARRIS, H. W.; BALDWIN, S. A.; HAMME, J. D. VAN; GARDNER, W. C.; FRASER, L.

- H. Genomics to assist mine reclamation: A review. **Restoration Ecology**, v. 24, n. 2, p. 165–173, 2016. doi: 10.1111/rec.12322
- GASTAUER, M.; SOUZA FILHO, P. W. M.; RAMOS, S. J.; CALDEIRA, C. F.; SILVA, J. R.; SIQUEIRA, J. O.; FURTINI NETO, A. E. Mine land rehabilitation in Brazil: Goals and techniques in the context of legal requirements. **Ambio**, v. 48, p. 47-88, 2018a. doi: 10.1007/s13280-018-1053-8
- GASTAUER, M.; SILVA, J. R.; CALDEIRA JUNIOR, C. F.; RAMOS, S. J.; SOUZA FILHO, P. W. M.; FURTINI NETO, A. E.; SIQUEIRA, J. O. Mine land rehabilitation: Modern ecological approaches for more sustainable mining. **Journal of Cleaner Production**, v. 172, p. 1409–1422, 2018b.
- GASTAUER, M.; CALDEIRA, C.; RAMOS, S.; SILVA, D.; SIQUEIRA, J. Active rehabilitation of Amazonian sand mines converges soils, plant communities and environmental status to predisturbance levels. **Land degradation & development**, 2019 (no prelo).
- GEYER, K. M.; KYKER-SNOWMAN, E.; GRANDY, A. S.; FREY, S. D. Microbial carbon use efficiency: accounting for population, community, and ecosystem-scale controls over the fate of metabolized organic matter. **Biogeochemistry**, v. 127, n. 2–3, p. 173–188, 2016. doi: 10.1007/s10533-016-0191-y
- GROVER, M.; ALI, S. Z.; SANDHYA, V.; RASUL, A.; VENKATESWARLU, B. Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 5, p. 1231–1240, 2011. doi: 10.1007/s11274-010-0572-7
- GOLBECK, J. H. Photosystem I in Cyanobacteria. *In*: Bryant D.A. (eds) *The Molecular Biology of Cyanobacteria. Advances in Photosynthesis*, vol 1. Springer, Dordrecht. 1994. p. 319–360. doi: 10.1007/978-94-011-0227-8_10
- HARUTA, S.; KANNO, N. Survivability of Microbes in Natural Environments and Their Ecological Impacts. **Microbes and environment**, v. 30, p. 123-125, 2015. doi: 10.1264/jsme2.ME3002rh
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) 2012. *Manual Técnico da Vegetação Brasileira*. IBGE, Rio de Janeiro.
- ISSA, O. M.; DÉFARGE, C.; BISSONNAIS, Y. LE; MARIN, B.; DUVAL, O.; BRUAND, A.; D'ACQUI, L. P.; NORDENBERG, S.; ANNERMAN, M. Effects of the inoculation of cyanobacteria on the microstructure and the structural stability of a tropical soil. **Plant and Soil**, v. 290, n. 1–2, p. 209–219, 2007. doi: 10.1007/s11104-006-9153-9
- JONES, R. T. A Comprehensive Survey of Soil Rhizobiales Diversity Using High-Throughput DNA Sequencing. **Biological Nitrogen Fixation**, v. 2–2, p. 769–776, 2015. doi: 10.1002/9781119053095.ch76

- KEIBLINGER, K. M.; WILHARTITZ, I. C.; SCHNEIDER, T.; ROSCHITZKI, B.; SCHMID, E.; EBERL, L.; RIEDEL, K.; ZECHMEISTER-BOLTENSTERN, S. Soil metaproteomics - Comparative evaluation of protein extraction protocols. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 54, p. 14–24, 2012. doi: 10.1016/j.soilbio.2012.05.014
- KERNER, M. J.; NAYLOR, D. J.; ISHIHAMA, Y.; MAIER, T.; CHANG, H. C.; STINES, A. P.; GEORGOPOULOS, C.; FRISHMAN, D.; HAYER-HARTL, M.; MANN, M.; HARTL, F. U. Proteome-wide analysis of chaperonin-dependent protein folding in *Escherichia coli*. **Cell**, v. 122, n. 2, p. 209–220, 2005. doi: 10.1016/j.cell.2005.05.028
- LI, Y., WEN, H., CHEN, L., YIN, T. Succession of Bacterial Community Structure and Diversity in Soil along a Chronosequence of Reclamation and Re-Vegetation on Coal Mine Spoils in China. **PLOS one**, v. 9: e115024. doi: 10.1371/journal.pone.0115024
- LIANG, C.; SCHIMEL, J. P.; JASTROW, J. D. The importance of anabolism in microbial control over soil carbon storage. **Nature Microbiology**, v. 2, p. 1-6, 2017. doi: 10.1038/nmicrobiol.2017.105
- LÓPEZ-MAURY, L.; MARGUERAT, S.; BÄHLER, J. Tuning gene expression to changing environments: From rapid responses to evolutionary adaptation. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 8, p. 583–593, 2008. doi: 10.1038/nrg2398
- LOSFELD, G.; L'HUILLIER, L.; FOGLIANI, B.; JAFFRÉ, T.; GRISON, C. Mining in New Caledonia: environmental stakes and restoration opportunities. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 8, p. 5592–5607, 2015. doi: 10.1007/s11356-014-3358-x
- MAKOI, J; NDAKIDEMI, P. Selected soil enzymes: examples of their potential roles in the ecosystem. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 181–191, 2008. doi: 10.5897/AJB07.590
- MALIK, A. A. *et al.* Land use driven change in soil pH affects microbial carbon cycling processes. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2018. doi: 10.1038/s41467-018-05980-1
- MANDALAKIS, M.; PANIKOV, N. S.; POLYMENAKOU, P. N.; SIZOVA, M. V.; STAMATAKIS, A. A simple cleanup method for the removal of humic substances from soil protein extracts using aluminum coagulation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 24, p. 23845–23856, 2018. doi: 10.1007/s11356-018-2434-z
- MATTAROZZI, M.; MANFREDI, M.; MONTANINI, B.; GOSETTI, F.; SANANGELANTONI, A., M.; MARENGO, E.; CARERI, M.; VISIOLI, G. A metaproteomic approach dissecting major bacterial functions in the rhizosphere of plants living in serpentine soil. **Anal Bioanal Chem.** v. 409, p. 2327-2339, 2017. doi: 10.1007/s00216-016-0175-8
- MENDES, L. W.; TSAI, S. M.; HOLLANDER, M. DE; NAVARRETE, A. A.; KURAMAE, E. E.; VEEN, J. A. VAN. Soil-Borne Microbiome: Linking Diversity to Function. **Microbial Ecology**, v. 70, n. 1, p. 255–265, 2015. doi: 10.1007/s00248-014-0559-2

- MESUERE, B., DEBYSER, G., AERTS, M., DEVREESE, B., VANDAMME, P., DAWYNDT, P., 2015. The Unipept metaproteomics analysis pipeline. **Proteomics**, 15, 1437–1442. doi: 10.1002/pmic.201400361
- MESUERE, B.; JEUGT, F. VAN DER; WILLEMS, T.; NAESSENS, T.; DEVREESE, B.; MARTENS, L.; DAWYNDT, P. High-throughput metaproteomics data analysis with Unipept: A tutorial. **Journal of Proteomics**, v. 171, p. 11–22, 2018. doi: 10.1016/j.jprot.2017.05.022
- MIRALLES, I.; DOMINGO, F.; CANTÓN, Y.; TRASAR-CEPEDA, C.; LEIRÓS, M. C.; GIL-SOTRES, F. Hydrolase enzyme activities in a successional gradient of biological soil crusts in arid and semi-arid zones. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 53, p. 124–132, 2012. doi: 10.1016/j.soilbio.2012.05.016
- NADAL, E.; AMMERER, G.; POSAS, F. Controlling gene expression in response to stress. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 12, p. 833–845, 2011. doi: 10.1038/nrg3055
- NESVIZHSKII, A.; KELLER, A.; KOLLER, E.; AEBERSOLD, R. A statisticiam model for identify proteins by tandem mass spectrometry. **Analitical Chemistry**, v. 75, n. 17, p. 4646–4658. 2003. doi: 10.1021/ac0341261
- NUNES, J. A.; SHAEFER, C. E. G. R.; JÚNIOR, W. G. F.; NERI, A. V.; CORREA, G. R.; NEAL, J. E. Soil-vegetation relationships on a banded ironstone island, Carajás Plateau, Brazilian Eastern Amazonia. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.87, n.4, 2015. doi: 10.1590/0001-376520152014-0106
- QUADROS, P. D. DE; ZHALNINA, K.; DAVIS-RICHARDSON, A. G.; DREW, J. C.; MENEZES, F. B.; CAMARGO, F. A. D. O.; TRIPLETT, E. W. Coal mining practices reduce the microbial biomass, richness and diversity of soil. **Applied Soil Ecology**, v. 98, p. 195–203, 2016. doi: 10.1016/j.apsoil.2015.10.016
- RODRIGUES, J. L. M. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 3, p. 988–993, 2013. doi: 10.1073/pnas.1220608110
- RIBEIRO, R. A.; GIANNINI, T. C.; GASTAUER, M.; AWADE, M.; SIQUEIRA, J. O. Topsoil application during the rehabilitation of a manganese tailing dam increases plant taxonomic, phylogenetic and functional diversity. **Journal of Environmental Management**, v. 227, p. 386–394, 2018. doi: 10.1016/j.jenvman.2018.08.060
- SCHAEFER, C. E.; CÂNDIDO, H. G.; CORRÊA, G. R.; PEREIRA, A.; NUNES, J. A.; SOUZA, O. F.; MARINS, A.; FILHO, E. F.; KER, J. C. Solos desenvolvidos sobre canga ferruginosa no Brasil: uma revisão crítica e papel ecológico de termiteiros. In: CARMO, F. F. & KAMINO L. H. Y. *Geossistemas Ferruginosos do Brasil: Áreas Prioritárias para a Conservação da Diversidade Geológica e Biológica, Patrimônio Cultural e Serviços Ambientais*. Belo Horizonte: 3i editora, 2015. p. 77-102.

SCHIMEL, J., BALSER, T. C. AND WALLENSTEIN, M. Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. **Ecology**, v. 88, p. 1386-1394, 2007. doi:10.1890/06-0219

STARKE, R.; JEHLICH, N.; BASTIDA, F. Using proteins to study how microbes contribute to soil ecosystem services: The current state and future perspectives of soil metaproteomics. **Journal of Proteomics**, v. 198, p. 50-58, 2019. doi: 10.1016/j.jprot.2018.11.011

STRUECKER, J.; JOERGENSEN, R. G. Microorganisms and their substrate utilization patterns in topsoil and subsoil layers of two silt loams, differing in soil organic C accumulation due to colluvial processes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 91, p. 310–317, 2015. doi: 10.1016/j.soilbio.2015.09.011

SUN, X.; ZHOU, Y.; TAN, Y.; WU, Z.; LU, P.; ZHANG, G.; YU, F. Restoration with pioneer plants changes soil properties and remodels the diversity and structure of bacterial communities in rhizosphere and bulk soil of copper mine tailings in Jiangxi Province, China. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 22106–22119, 2018. doi: 10.1007/s11356-018-2244-3

THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM. The Gene Ontology Resource: 20 years and still GOing strong. *Nucleic Acids Res.* Jan 2019;47(D1):D330-D338. doi: 10.1093/nar/gky1055

TIAN, Q.; YANG, X.; WANG, X.; LIAO, C.; LI, Q.; WANG, M.; WU, Y.; LIU, F. Microbial community mediated response of organic carbon mineralization to labile carbon and nitrogen addition in topsoil and subsoil. **Biogeochemistry**, v. 128, n. 1–2, p. 125–139, 2016. doi: 10.1007/s10533-016-0198-4

VICKERS, H.; GILLESPIE, M.; GRAVINA, A. Assessing the development of rehabilitated grasslands on post-mined landforms in north west Queensland, Australia. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 163, p. 72–84, 2012. doi: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2012.05.024>

VRANOVA, V.; REJSEK, K.; FORMANEK, P. Proteolytic activity in soil: A review. **Applied Soil Ecology**, v. 70, p. 23–32, 2013. doi: 10.1016/j.apsoil.2013.04.003

WANG, W.; VIGNAN, R.; SCALI, M.; CRESTI, M. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. **Electrophoresis**, v. 27, p. 2782-2786, 2006. doi: 10.1002/elps.200500722

WESSELBORG, S.; STORK, B. Autophagy signal transduction by ATG proteins: From hierarchies to networks. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 24, p. 4721–4757, 2015. doi: 10.1007/s00018-015-2034-8

WIMBERLY, B. T.; BRODERSEN, D. E.; JR, W. M. C.; MORGAN-WARREN, R. J.; CARTER, A. P.; VONRHEIN, C.; HARTSCH, T.; RAMAKRISHNAN, V. Structure of the 30S ribosomal subunit. **Nature**, p. 327-339, 2000. doi: 10.1038/35030006

YAMAGUCHI, K.; SUBRAMANIAN, A. R. The plastid ribosomal proteins. Identification of all the proteins in the 50 S subunit of an organelle ribosome (chloroplast). **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 37, p. 28466–28482, 2000. doi: 10.1074/jbc.M005012200

ZAGO, L. M. S.; OLIVEIRA, R. N.; BOMBONATTO, A. K. G.; MOREIRA, L. M. O.; MELO, E. N. P.; CARAMORI, S. S. Enzimas Extracelulares de Solos de Cerrado como Bioindicadores de Qualidade em Áreas Agricultáveis em Goiás, Brasil. **Fronteiras: Journal of Social, Technological and Environmental Science**, v. 5, n. 1, p. 104, 2016. doi: 10.21664/2238-8869.2016v5i1.p104-127

ZAMPIERI, E.; CHIAPELLO, M.; DAGHINO, S.; BONFANTE, P.; MELLO, A. Soil metaproteomics reveals an inter-kingdom stress response to the presence of black truffles. **Scientific Reports**. v. 6, 2016. doi: 10.1038/srep25773.

APÊNDICE A – Material Suplementar do Capítulo 1

Tabela S1. Valores quantitativos de proteínas identificadas nos solos de canga e floresta (total de espectros normalizados).

Proteínas Identificadas	Número de acesso	Floresta	Canga
Glycosyltransferase OS=Selaginella moellendorffii	D8S9G7_SELML	4,250.40	0
Cysteine--tRNA ligase OS=Shewanella piezotolerans	SYC_SHEPW	5,183.00	0
30S ribosomal protein S11 OS=Shewanella amazonensis	RS11_SHEAM	30250	0
Pantothenate synthetase OS=Syntrophobacter fumaroxidans	PANC_SYNFM	9,494.50	0
Chaperone protein DnaK OS=Leptothrix cholodnii	DNAK_LEPCP	8,708.00	0
Uncharacterized protein OS=Musa acuminata subsp. malaccensis	M0T0A4_MUSAM	64558	0
Uncharacterized protein OS=Musa acuminata subsp. malaccensis	M0T193_MUSAM	4,441.00	0
D-inositol 3-phosphate glycosyltransferase OS=Segniliparus rotundus	MSHA_SEGRD	61407	0
Actin OS=Scherffelia dubia	ACT_SCHDU	69502	0
Nuclear distribution protein nudF 1 OS=Penicillium rubens	LIS11_PENRW	1,249.80	0
Chaperone protein DnaK OS=Maricaulis maris	DNAK_MARMM	1,839.40	0
Alpha-1,3-mannosyltransferase CMT1 OS=Cryptococcus neoformans	CMT1_CRYNJ	7,980.00	0
Threonine--tRNA ligase OS=Thiobacillus denitrificans	SYT_THIDA	11390	0
Putative uncharacterized protein (Fragment) OS=Selaginella moellendorffii	D8QZF3_SELML	8,753.00	0
Predicted protein OS=Physcomitrella patens subsp. Patens	A9SXX8_PHYPA	3,511.00	0
Aspartate carbamoyltransferase OS=Jannaschia sp.	PYRB_JANSC	8,045.30	0
Uncharacterized protein OS=Musa acuminata	M0TXZ2_MUSAM	33570	0
Elongation factor 4 OS=Aeromonas hydrophila	LEPA_AERHH	44248	0
Putative choline kinase OS=Schizosaccharomyces pombe	KICH_SCHPO	4,909.70	0
Glutaredoxin-2 OS=Schizosaccharomyces pombe	GLRX2_SCHPO	11856	0
Predicted protein OS=Physcomitrella patens	A9T9J1_PHYPA	4,037.70	0
40S ribosomal protein S1 OS=Candida albicans	RS3A_CANAL	19687	0
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)] 2 OS=Zygosaccharomyces rouxii	GPD2_ZYGRO	5,076.00	0
Predicted protein OS=Physcomitrella patens	A9U5L0_PHYPA	432010	0
60 kDa chaperonin 2 OS=Frankia sp.	CH602_FRASC	10162	0
Uncharacterized protein OS=Amborella trichopoda	U5D0J0_AMBTC	4,772.30	0
Extracellular basic protease OS=Dichelobacter nodosus	BPRV_DICNO	21022	0

Predicted protein OS=Physcomitrella patens subsp. patens	A9SHX1_PHYPA	2,488.70	0
Predicted protein OS=Physcomitrella patens subsp. patens	A9SIP3_PHYPA	11574	0
DNA ligase OS=Salinispora arenicola	DNLJ_SALAI	15069	0
60 kDa chaperonin OS=Thiomicrospira crunogena	CH60_THICR	4,187.40	0
33 kDa chaperonin OS=Clostridium botulinum	HSLO_CLOBB	5,420.00	0
Protein phosphatase CheZ OS=Yersinia pestis	CHEZ_YERPE	14247	0
Replicative DNA helicase OS=Rickettsia typhi	DNAB_RICTY	16288	0
Protein SspF OS=Bacillus cereus	SSPF_BACCE	4,500.30	0
Predicted protein OS=Physcomitrella patens	A9U1J3_PHYPA	2,967.70	0
Elongation factor Tu OS=Coxiella burnetii	EFTU_COXBN	15417	0
Actin-1 OS=Zea mays	ACT1_MAIZE	15185	0
Uncharacterized protein OS=Amborella trichopoda	WINK91_AMBTC	3,686.00	0
GTPase Obg OS=Mycobacterium gilvum	OBG_MYCGI	24005	0
Leucine--tRNA ligase OS=Deinococcus radiodurans	SYL_DEIRA	6,555.30	0
Aspartate--tRNA(Asp/Asn) ligase OS=Nocardia farcinica	SYDND_NOCFA	7,233.00	0
60 kDa chaperonin 1 OS=Mycobacterium leprae	CH601_MYCLE	4,626.90	0
Enolase OS=Aquifex aeolicus	ENO_AQUAE	11182	0
Glucose-1-phosphate adenylyltransferase OS=Shewanella putrefaciens	GLGC_SHEPC	12226	0
Putative uncharacterized protein OS=Selaginella moellendorffii	D8T477_SELML	10564	0
Uncharacterized protein OS=Musa acuminata	M0SV76_MUSAM	2,208.40	0
L-fucose isomerase OS=Streptococcus pneumoniae	FUCI_STRPN	10136	0
50S ribosomal protein L5 OS=Staphylococcus carnosus	RL5_STACT	11267	0
Actin-1 OS=Glycine max	ACT1_SOYBN	8,810.90	0
ATPase synthesis protein 25, mitochondrial OS=Neosartorya fischeri	ATP25_NEOFI	953.67	0
Elongation factor Tu OS=Selaginella moellendorffii	D8S6G0_SELML	4,854.90	0
4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase OS=Mycobacterium vanbaalenii	DAPB_MYCVP	4,055.70	0
Histone-lysine N-methyltransferase ATX2 OS=Arabidopsis thaliana	ATX2_ARATH	14164	0
Uncharacterized protein OS=Musa acuminata	M0T7R2_MUSAM	9,116.70	0
ATP synthase subunit beta 2 OS=Chlorobium tepidum	ATPB2_CHLTE	29568	0
Structure-specific endonuclease subunit slx4 OS=Botryotinia fuckeliana	SLX4_BOTFB	25977	0

Threonine synthase OS=Bacillus sp.	THRC_BACSL	10016	0
Propionyl-CoA carboxylase beta chain OS=Rhodobacter sphaeroides	PCCB_RHOS4	14618	0
UPF0753 protein YbcC OS=Bacillus subtilis	YBCC_BACSU	15952	0
Terpene synthase OS=Selaginella moellendorffii	D8QSG2_SELML	7,537.70	0
Histone H2B OS=Selaginella moellendorffii	D8SSH2_SELML	6,851.00	0
Nitrogen fixation protein AnfA OS=Azotobacter vinelandii	ANFA_AZOVI	10003	0
DNA ligase OS=Synechococcus sp.	DNLJ_SYNJB	18435	0
Methionine--tRNA ligase OS=Chlorobium phaeovibrioides	SYM_CHLPM	16458	0
Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase OS=Stenotrophomonas maltophilia	PUR7_STRM5	19794	0
Putative uncharacterized protein (Fragment) OS=Selaginella moellendorffii	D8SCP4_SELML	28312	0
Uncharacterized protein OS=Musa acuminata subsp. malaccensis	M0RKR9_MUSAM	39517	0
Uncharacterized protein OS=Musa acuminata subsp. malaccensis	M0TLK0_MUSAM	13942	0
Uncharacterized protein OS=Amborella trichopoda	W1PJV7_AMBTC	5,476.20	0
tRNA uridine 5-carboxymethylaminomethyl modification enzyme MnmG OS=Streptococcus sanguinis	MNMG_STRSV	4,753.80	0
Response regulator mcs4 OS=Schizosaccharomyces pombe	MCS4_SCHPO	13390	0
Protein MUM2 OS=Saccharomyces cerevisiae	MUM2_YEAST	1,221.30	0
Dihydroxy-acid dehydratase OS=Oceanobacillus iheyensis	ILVD_OCEIH	19243	0
Mitochondrial import receptor subunit tom40 OS=Neurospora crassa	TOM40_NEUCR	5,831.30	0
Uncharacterized protein OS=Amborella trichopoda	U5CMV7_AMBTC	6,532.70	0
Bifunctional enzyme NodQ OS=Rhizobium tropici	NODQ_RHITR	90101	0
Uncharacterized protein OS=Amborella trichopoda	U5CSP2_AMBTC	2,371.30	0
Heme/hemopexin utilization protein C OS=Haemophilus influenzae	HXUC_HAEI8	6,328.30	0
Valine--tRNA ligase OS=Staphylococcus saprophyticus	SYV_STAS1	10411	0
Phenylloxazoline synthase MbtB OS=Mycobacterium tuberculosis	MBTB_MYCTO	34553	0
Isoleucine--tRNA ligase OS=Staphylococcus aureus	SYI2_STAAU	7,761.00	0
UvrABC system protein B OS=Clostridium perfringens	UVRB_CLOPE	4,450.00	0
Putative uncharacterized protein OS=Selaginella moellendorffii	D8QPA5_SELML	48164	0
Argininosuccinate lyase OS=Methylocella silvestris	ARLY_METSB	14505	0
Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1 OS=Schizosaccharomyces pombe	SND1_SCHPO	11098	0

Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 12 OS=Debaryomyces hansenii	SRB8_DEBHA	12284	0
Uncharacterized protein OS=Musa acuminata	M0TWI1_MUSAM	5,325.50	0
Chaperone protein HtpG OS=Clostridium botulinum	HTPG_CLOBJ	7,797.30	0
Acetyl-coenzyme A synthetase OS=Helicobacter acinonychis	ACSA_HELAH	4,184.10	0
Acetyl-coenzyme A synthetase OS=Helicobacter pylori	ACSA_HELPG	18261	0
Predicted protein OS=Physcomitrella patens	A9T2D3_PHYPA	9,690.00	0
Polyribonucleotide nucleotidyltransferase OS=Pseudomonas fluorescens	PNP_PSEFS	6,707.80	0
Putative uncharacterized protein OS=Selaginella moellendorffii	D8RKV0_SELML	5,130.30	0
Elongation factor Tu OS=Musa acuminata	M0TN07_MUSAM	17403	0
Predicted protein OS=Physcomitrella patens	A9S9J4_PHYPA	2,451.30	0
Predicted protein OS=Physcomitrella patens	A9TRS7_PHYPA	3,254.50	0
Predicted protein OS=Physcomitrella patens	A9TMI8_PHYPA	9,032.90	0
Predicted protein OS=Physcomitrella patens	A9T9H6_PHYPA	21740	0
Actin-1 OS=Suillus bovinus	ACT1_SUIBO	7,925.70	0
Putative uncharacterized protein OS=Selaginella moellendorffii	D8SBC9_SELML	8,163.50	0
60 kDa chaperonin 2 OS=Rhodococcus jostii	CH602_RHOJR	853.35	2,474.00
DNA-directed RNA polymerase subunit beta OS=Thermosiphon melanesiensis	RPOC_THEM4	45239	2,378.00
DNA-directed RNA polymerase subunit beta OS=Thermosiphon africanus	RPOC_THEAB	60487	6,023.40
Putative histone deacetylase complex, SIN3 component OS=Physcomitrella patens	A9SPL5_PHYPA	10332	5,867.30
Hemolysin, chromosomal OS=Escherichia coli	HLYAC_ECOLX	13579	0
Putative uncharacterized protein OS=Selaginella moellendorffii	D8RKC8_SELML	8,141.00	14561
Uncharacterized protein OS=Musa acuminata	M0TV97_MUSAM	2,524.00	0
Uncharacterized protein OS=Musa acuminata	M0SV91_MUSAM	11449	5,956.30
Elongation factor Tu OS=Geobacter sulfurreducens	EFTU_GEOSL	22114	0
Elongation factor Tu-A OS=Vibrio cholerae	EFTU1_VIBCH	2,088.00	7,347.50
DNA-directed RNA polymerase subunit beta OS=Parabacteroides distasonis	RPOC_PARD8	444330	7,461.20
Protein translocase subunit SecA OS=Xanthomonas campestris	SECA_XANC5	1,583.20	2,890.20
Phytochrome (Fragment) OS=Ricciolepis natans	A0A0K0NQG4_RICNA	370.49	0
Phytochrome (Fragment) OS=Selaginella kraussiana	A0A0K0NQL7_9TRAC	262.02	0
Phytochrome (Fragment) OS=Leiosporoceros dussii	A0A0K0NQS5_9EMBR	883.44	0

Phytochrome (Fragment) OS=Mesotaenium kramstae	A0A0K0NQR4_9VIRI	7,955.40	0
Phytochrome OS=Physcomitrella patens	A9T4N3_PHYPA	59.04	0
Phytochrome (Fragment) OS=Leucobryum albidum	A0A0K0NQQ8_9BRYO	714.04	1,810.00
Phytochrome (Fragment) OS=Syntrichia princeps	A0A0K0NQW7_9BRYO	7,642.00	1,929.30
Phytochrome (Fragment) OS=Osmundastrum cinnamomeum	A0A0K0NQF8_OSMCI	12659	6,281.00
Uncharacterized protein OS=Musa acuminata	M0REB7_MUSAM	24638	0
Uncharacterized protein OS=Musa acuminata	M0SN59_MUSAM	11132	0
Putative uncharacterized protein OS=Selaginella moellendorffii	D8RYS9_SELML	2,696.80	0
Putative uncharacterized protein OS=Selaginella moellendorffii	D8SUY5_SELML	2,639.70	0
Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37c OS=Arabidopsis thaliana	MD37C_ARATH	1,065.80	0
Uncharacterized protein OS=Amborella trichopoda	WINZ92_AMBTC	7,982.50	0
Heat shock 70 kDa protein OS=Emericella nidulans	HSP70_EMENI	14917	0
Heat shock protein SSA3 OS=Saccharomyces cerevisiae	HSP73_YEAST	2,310.20	0
Heat shock protein SSA2 OS=Candida albicans	HSP72_CANAL	32298	0
Heat shock 70 kDa protein OS=Neurospora crassa	HSP70_NEUCR	41014	0
Heat shock 70 kDa protein OS=Blastocladiella emersonii	HSP70_BLAEM	2,052.70	0
Heat shock 70 kDa protein 3 OS=Arabidopsis thaliana	HSP7C_ARATH	850.19	0
Predicted protein OS=Physcomitrella patens	A9T7Y9_PHYPA	14573	0
Predicted protein OS=Physcomitrella patens	A9SNZ3_PHYPA	58818	4,172.90
Uncharacterized protein OS=Musa acuminata	M0SX51_MUSAM	8,874.00	6,872.20
Chaperone protein DnaK OS=Nitrosococcus oceani	DNAK_NITOC	8,739.20	0
Chaperone protein DnaK OS=Methylobacterium Populi	DNAK_METPB	8,341.00	0
Chaperone protein DnaK OS=Campylobacter concisus	DNAK_CAMC1	31486	285.9
Chaperone protein DnaK OS=Thermus thermophilus	DNAK_THET8	2,850.60	1,845.50
Chaperone protein DnaK OS=Vibrio fischeri	DNAK_VIBFM	102550	2,422.30
Chaperone protein DnaK OS=Wolbachia pipientis	DNAK_WOLPP	1,936.80	2,922.90
Chaperone protein DnaK OS=Wigglesworthia glossinidia	DNAK_WIGBR	90122	3,046.40
Chaperone protein DnaK OS=Sinorhizobium medicae	DNAK_SINMW	2,713.20	0
Chaperone protein DnaK OS=Xylella fastidiosa	DNAK_XYLFA	29386	0
Chaperone protein DnaK OS=Thioalkalivibrio sulfidiphilus	DNAK_THISH	13254	0

Chaperone protein DnaK OS=Koribacter versatilis	DNAK_KORVE	7,205.40	0
Chaperone protein DnaK OS=Xanthomonas oryzae	DNAK_XANOM	23523	0
Chaperone protein DnaK OS=Chlorobaculum parvum	DNAK_CHLP8	10766	0
Chaperone protein DnaK OS=Geobacter lovleyi	DNAK_GEOLS	235.94	0
Chaperone protein DnaK OS=Flavobacterium johnsoniae	DNAK_FLAJ1	4,134.10	0
Chaperone protein DnaK OS=Amoebophilus asiaticus	DNAK_AMOA5	4,015.80	0
Chaperone protein DnaK OS=Solibacter usitatus	DNAK_SOLUE	5,501.10	3,302.90
Chaperone protein DnaK OS=Magnetococcus marinus	DNAK_MAGMM	14902	0
Chaperone protein dnaK2 OS=Prochlorococcus marinus	DNAK2_PROMM	7,939.40	0
Chaperone protein DnaK OS=Flavobacterium psychrophilum	DNAK_FLAPJ	3,609.50	0
Chaperone protein DnaK OS=Azorhizobium caulinodans	DNAK_AZOC5	5,509.00	0
Chaperone protein DnaK OS=Rhodobacter capsulatus	DNAK_RHOCA	14079	0
Chaperone protein DnaK OS=Rhodobacter sphaeroides	DNAK_RHOS4	7,594.20	0
Chaperone protein DnaK OS=Jannaschia sp.	DNAK_JANSC	7,241.80	0
Chaperone protein DnaK OS=Campylobacter hominis	DNAK_CAMHC	23896	0
Chaperone protein DnaK OS=Chlorobium chlorochromatii	DNAK_CHLCH	8,620.80	0
Chaperone protein DnaK OS=Campylobacter lari	DNAK_CAMLR	67116	4,989.20
Chaperone protein DnaK 1 OS=Photobacterium profundum	DNAK1_PHOPR	10680	0
Predicted protein OS=Physcomitrella patens	A9TCC2_PHYPA	4,571.10	1,087.90
Predicted protein OS=Physcomitrella patens	A9TDN5_PHYPA	5,633.50	1,587.40
Predicted protein OS=Physcomitrella patens	A9RRJ3_PHYPA	17163	1,631.60
Predicted protein OS=Physcomitrella patens	A9TWR8_PHYPA	4,085.90	1,950.40
Predicted protein OS=Physcomitrella patens	A9SIM8_PHYPA	0	2,494.60
Predicted protein OS=Physcomitrella patens	A9RUU2_PHYPA	0	3,411.70
Predicted protein OS=Physcomitrella patens	A9S3I7_PHYPA	24325	3,706.00
Predicted protein OS=Physcomitrella patens	A9RUQ4_PHYPA	13880	4,526.60
Predicted protein OS=Physcomitrella patens	A9T637_PHYPA	83.208	0
Predicted protein OS=Physcomitrella paten	A9TAT1_PHYPA	16517	0
Predicted protein OS=Physcomitrella patens	A9RZ97_PHYPA	8,333.00	0
Predicted protein OS=Physcomitrella patens	A9TC43_PHYPA	38390	6,660.30

Predicted protein OS= <i>Physcomitrella patens</i>	A9RPU8_PHYPA	2,848.40	0
60 kDa chaperonin OS= <i>Dichelobacter nodosus</i>	CH60_DICNV	1,043.20	1,467.70
60 kDa chaperonin OS= <i>Oleispira antarctica</i>	CH60_OLEAN	5,425.10	1,505.70
60 kDa chaperonin OS= <i>Gardnerella vaginalis</i>	CH60_GARVA	12643	0
60 kDa chaperonin OS= <i>Staphylococcus aureus</i>	CH60_STAAU	310.49	0
60 kDa chaperonin 2 OS= <i>Rhizobium loti</i>	CH602_RHILO	776.9	1,812.10
60 kDa chaperonin OS= <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	CH60_MARHV	493.63	0
60 kDa chaperonin 1 OS= <i>Acaryochloris marina</i>	CH601_ACAMI	1,938.60	0
60 kDa chaperonin OS= <i>Lawsonia intracellularis</i>	CH60_LAWIP	60.583	0
60 kDa chaperonin OS= <i>Clostridium beijerinckii</i>	CH60_CLOB8	429.36	0
60 kDa chaperonin OS= <i>Thermotoga neapolitana</i>	CH60_THENE	37215	0
60 kDa chaperonin OS= <i>Scardovia inopinata</i>	CH60_SCAIO	3,936.30	0
60 kDa chaperonin OS= <i>Marinomonas</i> sp.	CH60_MARMS	7,064.10	0
60 kDa chaperonin OS= <i>Brevibacillus choshinensis</i>	CH60_BRECH	2,199.10	0
60 kDa chaperonin 1 OS= <i>Saccharopolyspora erythraea</i>	CH601_SACEN	1,841.40	0
60 kDa chaperonin 2 OS= <i>Saccharopolyspora erythraea</i>	CH602_SACEN	459.27	0
60 kDa chaperonin OS= <i>Solibacter usitatus</i>	CH60_SOLUE	36059	2,087.10
60 kDa chaperonin 2 OS= <i>Myxococcus xanthus</i>	CH602_MYXXD	126.03	0
60 kDa chaperonin 1 OS= <i>Vibrio cholerae</i> serotype O1	CH601_VIBC3	3,500.10	0
60 kDa chaperonin OS= <i>Xylella fastidiosa</i>	CH60_XYLFA	3,476.40	0
60 kDa chaperonin OS= <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	CH60_LEUMM	1,636.30	0
60 kDa chaperonin OS= <i>Alcanivorax borkumensis</i>	CH60_ALCBS	39.601	0
60 kDa chaperonin OS= <i>Lactobacillus plantarum</i>	CH60_LACPL	4,281.90	0
60 kDa chaperonin OS= <i>Macrococcus caseolyticus</i>	CH60_MACCJ	14440	0
60 kDa chaperonin OS= <i>Acidovorax ebreus</i>	CH60_ACJET	246.66	0
60 kDa chaperonin OS= <i>Polaromonas</i> sp.	CH60_POLSJ	1,011.90	0
60 kDa chaperonin OS= <i>Methylobacillus flagellatus</i>	CH60_METFK	7,658.00	2,246.30
60 kDa chaperonin 2 OS= <i>Azoarcus</i> sp.	CH602_AZOSB	3,793.80	0
60 kDa chaperonin OS= <i>Ralstonia solanacearum</i>	CH60_RALSO	2,992.90	0
60 kDa chaperonin OS= <i>Shewanella frigidimarina</i>	CH60_SHEFN	2,282.20	0

60 kDa chaperonin OS=Thiobacillus denitrificans	CH60_THIDA	5,791.40	0
60 kDa chaperonin 2 OS=Rhodoferrax ferrireducens	CH602_RHOFT	10751	0
60 kDa chaperonin OS=Magnetococcus marinus	CH60_MAGMM	4,751.10	0
60 kDa chaperonin OS=Chloroherpeton thalassium	CH60_CHLT3	7,661.80	0
60 kDa chaperonin OS=Rhodobacter capsulatus	CH60_RHOCA	2,797.50	0
60 kDa chaperonin OS=Neisseria gonorrhoeae	CH60_NEIG1	928.95	0
60 kDa chaperonin OS=Pasteurella multocida	CH60_PASMU	178.43	0
60 kDa chaperonin OS=Hyphomonas neptunium	CH60_HYPNA	3,090.00	4,893.60
60 kDa chaperonin OS=Nitrosospira multiformis	CH60_NITMU	3,003.90	0
60 kDa chaperonin OS=Saccharophagus degradans	CH60_SACD2	5,220.90	0
60 kDa chaperonin 1 OS=Vibrio parahaemolyticus	CH601_VIBPA	1,979.50	0
60 kDa chaperonin OS=Wigglesworthia glossinidia	CH60_WIGBR	737.42	0
60 kDa chaperonin OS=Sodalis glossinidius	CH60_SODGL	3,883.80	0
60 kDa chaperonin OS=Dictyoglomus thermophilum	CH60_DICT6	822.85	0
60 kDa chaperonin 2 OS=Synechococcus sp.	CH602_SYNJB	177.31	0
60 kDa chaperonin 2 OS=Syntrophobacter fumaroxidans	CH602_SYNFM	2,886.00	0
60 kDa chaperonin OS=Polynucleobacter necessarius	CH60_POLNS	63500	0
60 kDa chaperonin 1 OS=Rhodospirillum rubrum	CH601_RHORT	201.05	0
60 kDa chaperonin 1 OS=Rhizobium loti	CH601_RHILO	843.84	5,989.00
60 kDa chaperonin OS=Serratia proteamaculans	CH60_SERP5	572.09	0
60 kDa chaperonin OS=Edwardsiella ictaluri	CH60_EDWI9	2,760.00	0
60 kDa chaperonin 1 OS=Rhodopseudomonas palustres	CH601_RHOPS	2,408.30	0
60 kDa chaperonin OS=Maricaulis maris	CH60_MARMM	1,417.60	0
60 kDa chaperonin OS=Rhodothermus marinus	CH60_RHOMR	10526	0
60 kDa chaperonin OS=Colwellia psychrerythraea	CH60_COLP3	6,717.30	0
60 kDa chaperonin OS=Lactobacillus johnsonii	CH60_LACJO	1,448.00	0
60 kDa chaperonin OS=Symbiobacterium thermophilum	CH60_SYMTH	29851	0
60 kDa chaperonin 1 OS=Erythrobacter litoralis	CH601_ERYLH	516.94	59.346
60 kDa chaperonin 2 OS=Sphingopyxis alaskensis	CH602_SPHAL	3,484.60	84.365
60 kDa chaperonin OS=Clostridium kluyveri	CH60_CLOK1	806.56	17702

60 kDa chaperonin OS=Caulobacter crescentus	CH60_CAUCN	5,842.20	86.048
60 kDa chaperonin OS=Granulibacter bethesdensis	CH60_GRABC	3,708.70	86.11
60 kDa chaperonin OS=Acidiphilium cryptum	CH60_ACICJ	19884	186.84
60 kDa chaperonin OS=Lactobacillus reuteri	CH60_LACRD	170.47	403
60 kDa chaperonin 2 OS=Burkholderia cenocepacia	CH602_BURCA	1,545.10	669.67
60 kDa chaperonin OS=Parvibaculum lavamentivorans	CH60_PARL1	2,512.10	879.34
60 kDa chaperonin 1 OS=Synechococcus sp.	CH601_SYNPW	4,616.40	889
60 kDa chaperonin 2 OS=Moorella thermoacetica	CH602_MOOTA	343.86	950.54
60 kDa chaperonin 2 OS=Methylococcus capsulatus	CH602_METCA	541.11	951.55
60 kDa chaperonin OS=Alkalilimnicola ehrlichii	CH60_ALKEH	3,021.10	992.94
60 kDa chaperonin 4 OS=Rhizobium loti	CH604_RHILO	5,124.70	45351
60 kDa chaperonin OS=Coprothermobacter proteolyticus	CH60_COPPD	407.31	1,171.80
DNA-directed RNA polymerase subunit beta OS=Rhizobium loti	RPOC_RHILO	15195	0
DNA-directed RNA polymerase subunit beta OS=Haemophilus somnus	RPOB_HAES1	16822	25.924
DNA-directed RNA polymerase subunit beta OS=Tolomonas auensis	RPOB_TOLAT	33798	27.818
DNA-directed RNA polymerase subunit beta OS=Haemophilus parasuis	RPOB_HAEPS	249.76	1,334.50
DNA-directed RNA polymerase subunit beta OS=Edwardsiella ictaluri	RPOB_EDWI9	7,811.90	2,010.20
DNA-directed RNA polymerase subunit beta OS=Mannheimia succiniciproducens	RPOB_MANSM	19052	2,398.70
DNA-directed RNA polymerase subunit beta OS=Desulfobacterium autotrophicum	RPOB_DESAH	11017	4,547.70
DNA-directed RNA polymerase subunit beta OS=Pseudoalteromonas haloplanktis	RPOB_PSEHT	167.63	7,620.40
Pre-mRNA-processing protein 40A OS=Arabidopsis thaliana	PR40A_ARATH	5,088.70	836.25
Uncharacterized protein OS=Amborella trichopoda	W1NSW1_AMBTC	5,372.30	916.67
Uncharacterized protein OS=Musa acuminata	M0SYD2_MUSAM	12977	1,136.70
Maturase K (Fragment) OS=Pedicularis palustres	H9AW44_PEDPU	0	1,358.00
Bifunctional cytochrome P450/NADPH--P450 reductase 1 OS=Bacillus subtilis	CYPD_BACSU	42088	1,373.00
RNA polymerase-associated protein RapA OS=Photobacterium profundum	RAPA_PHOPR	0	1,547.70
Tethering factor for nuclear proteasome STS1 OS=Ashbya gossypii	STS1_ASHGO	0	1,780.00
60 kDa chaperonin 1 OS=Protochlamydia amoebophila	CH601_PARUW	16206	1,830.30
Protein SCP160 OS=Saccharomyces cerevisiae	SC160_YEAST	3,599.70	2,081.00
Predicted protein OS=Physcomitrella patens	A9TEK9_PHYPA	18365	2,091.70

Protein translocase subunit SecA OS=Mycoplasma pulmonis	SECA_MYCPU	13549	2,152.20
Structure-specific endonuclease subunit SLX4 OS=Phaeosphaeria nodorum	SLX4_PHANO	3,048.30	2,198.30
Protein pacG OS=Emericella nidulans	PHOG_EMENI	3,684.70	2,450.30
Ribosomal protein L20 OS=Orobancha gracilis	WIINT4_9LAMI	0	2,822.30
Predicted protein OS=Physcomitrella patens	A9TRN7_PHYPA	6,535.80	2,936.70
Predicted protein OS=Physcomitrella patens	A9TH37_PHYPA	16216	3,013.90
Alanine--tRNA ligase OS=Bordetella avium	SYA_BORA1	12732	3,055.70
Isocitrate lyase OS=Hyphomicrobium methylovorum	ACEA_HYPME	0	3,100.00
Predicted protein OS=Physcomitrella patens	A9RVF9_PHYPA	16164	3,268.40
Predicted protein OS=Physcomitrella patens	A9TKC1_PHYPA	10730	3,459.70
Pentafunctional AROM polypeptide OS=Arthroderma otae	ARO1_ARTOC	3,171.30	3,826.30
Catalase-peroxidase OS=Talaromyces marneffeii	KATG_TALMA	3,202.90	3,863.60
MIKC* MADS-box transcription factor OS=Funaria hygrometrica	D3IZU4_FUNHY	0	3,990.00
Uncharacterized protein OS=Musa acuminata	M0TQE8_MUSAM	0	4,510.30
Probable endo-1,4-beta-xylanase C OS=Aspergillus terreus	XYNC_ASPTTE	0	5,703.70
Putative uncharacterized protein OS=Selaginella moellendorffii	D8R5Q7_SELML	3,799.60	6,582.70
Uncharacterized protein OS=Musa acuminata	M0SIF5_MUSAM	4,157.30	6,825.10
DNA-directed RNA polymerase subunit beta OS=Marinomonas sp.	RPOC_MARMS	4,608.70	6,908.30
Pheromone-processing carboxypeptidase kex1 OS=Aspergillus oryzae	KEX1_ASPOR	1,889.30	7,330.00
Antiviral helicase SKI2 OS=Saccharomyces cerevisiae	SKI2_YEAST	10118	7,475.00
DNA-directed RNA polymerase subunit beta OS=Arcobacter butzleri	RPOB_ARCB4	37543	7,704.00
Uncharacterized protein OS=Musa acuminata	M0SAV9_MUSAM	10251	7,918.70
Uncharacterized protein OS=Amborella trichopoda	W1PL18_AMBTC	41072	8,492.30
Elongation factor G 1 OS=Trichodesmium erythraeum	EFG1_TRIEI	0	8,504.00
Predicted protein OS=Physcomitrella patens	A9SDS5_PHYPA	0	9,616.00
Kinesin heavy chain OS=Syncephalastrum racemosum	KINH_SYNRA	33777	10709
Argininosuccinate lyase OS=Mycobacterium vanbaalenii	ARLY_MYCVP	0	11081
Protein TIME FOR COFFEE OS=Arabidopsis thaliana	TIC_ARATH	15265	13927
DNA-directed RNA polymerase, mitochondrial OS=Saccharomyces cerevisiae	RPOM_YEAST	11175	14445
Predicted protein OS=Physcomitrella patens	A9TDL0_PHYPA	0	15359

Putative uncharacterized protein OS=Selaginella moellendorffii	D8SCM7_SELML	9,996.00	19690
Poly [ADP-ribose] polymerase OS=Musa acuminata	M0T8N9_MUSAM	0	59535

APÊNDICE B – Extração, digestão e tratamento das amostras

Extração (Protocolo de Extração – Wang 2006, adaptado)

- 1) Prepara-se o tampão SDS denso (tabela 1), mantendo-o no gelo;
- 2) Pesa-se as amostras (~3 g) para cada tubo falcon de 15 ml;
- 3) Adiciona-se 10 µl do inibidor de protease em cada falcon;
- 4) Adiciona-se 630 µl de DTT (70 mM final) em cada falcon com 9 ml de tampão, deixando-os 10 min à temperatura ambiente;
- 5) Sonicar 6x de 30 segundos (potência ~80), com intervalos de 30-60 s no gelo;
- 6) Dividir a amostra do falcon em 8 eppendorfs (epp) – ziplock 2 ml, adicionando 1 ml da solução em cada;
- 7) Adicionar 700 µl de fenol em cada epp;
- 8) Vortexar por 15 min todos os epp;
- 9) Por a centrífuga no pré-cooling;
- 10) Centrifugar os epp a 14000 rpm por 7 min à 4°C;
- 11) Transferir o sobrenadante (parte fenólica) para epp limpos, juntando 2 em 1;
- 12) Centrifuga novamente a 14000 rpm por 7 min à 4 °C;
- 13) Transfere 700 µl do sobrenadante para um epp limpo;
- 14) Adiciona 700 µl de acetato de amônia em metanol (tabela 2);
- 15) Vortexar para misturar e guardar no -80 °C.

REAGENTES NECESSÁRIOS

Tabela 1. Tampão SDS denso (Wang 2003, adaptado)

Componentes	Conc. Estoque	Conc. Final	Vol. Final (9 ml)
1. Sacarose	1,5M	0,85 M	5,7 ml
2. Tris-HCl pH 8,0	1 M	0,1 M	1 ml
3. SDS	10%	2% (v/v)	2 ml
5. PMSF	100 mM	1 mM	0,1 ml
7. PVPP**	-	2%	0,2 g
8. H ₂ O miliQ	-	-	0,2 mL

Tabela 2. Solução de precipitação (Wang, 2003)

Componentes	Conc. final	Quantidade (g)	Metanol
Acetato de amônia em metanol	0,1 M	0,77	100 ml

Dissolver o acetato de amônia em metanol e manter a -20°C

Limpeza das amostras

- 1) Retirar as amostras do -80 °C;
- 2) Por a centrífuga no pré-cooling;
- 3) Centrifugar as amostras de 15 a 20 minutos 14000 rpm, 4 °C;

- 4) Descartar todo o líquido (em recipiente apropriado);
- 5) Adicionar 1500 µl de acetona 80% gelada (dividir essa quantidade nos epp, dissolver o pellet e juntar todos em um só, pipetar bastante para dissolver bem o pellet e vortexar um pouco);
- 6) Centrifugar por 7 min, 14000 rpm, 4 °C;
- 7) Descartar todo o líquido;
- 8) Repete-se as etapas 5, 6 e 7 por mais 2 ou 3x;
- 9) Adicionar 1500 µl de etanol 70% gelado;
- 10) Centrifugar por 7 min, 14000 rpm, 4 °C;
- 11) Descartar todo o líquido;
- 12) Secar as amostras por 30 min;
- 13) Adicionar 50 µl de rapigest 0,2 % em cada amostra, vortexar e/ou pipetar até dissolver bem o pellet;
- 14) Quantificar;
- 15) Guardar no -80 °C;

Digestão

Reagentes

1. Bicarbonato de amônio 50 mM: 50 mM de bicarbonato de amônio em água purificada (massa molar 79,06 g/mol; 79 mg em 20 mL de água purificada).
2. Ditioneitol (DTT) 0.5 M: 0.5 M de DTT em bicarbonato de amônio 50 mM (massa molar 154.25g/mol; 77,12 mg em 1 mL de bicarbonato de amônio 50 mM).
5. Cloreto de cálcio (CaCl₂) 0.1 M: 0.15 mg em 1 ml de água purificada (massa molar: 147.02 g/mol).
6. Iodoacetamida (IAA) 0.5 M: 0.5 M de IAA em bicarbonato de amônio 50 mM (massa molar 184.96 g/mol; 92,5 mg em bicarbonato de amônio 50 mM).
7. Solução de Tripsina: 20 ng/µL (Sequencing grade): solubilizar em bicarbonato de amônio 50 mM, alíquotar e armazenar a -20 °C.

Procedimento

1. Padronizar o volume das amostras completando com rapigest 0,1% *. O cálculo do volume é baseado na quantidade total de proteínas que será utilizada (geralmente 30 ou 50 µg) e na concentração de proteínas em cada amostra.
2. Redução: adicionar solução de DTT 5 mM final. Incubar durante 25 minutos a 56°C.
3. Alquilação: adicionar solução de IAA 14 mM final. Incubar durante 30 minutos à temperatura ambiente protegido da luz.
4. *Quench* da IAA livre: adicionar solução de DTT 5 mM final. Incubar durante 15 minutos à temperatura ambiente protegido da luz.
5. Adicionar solução de CaCl₂ 1 mM final.
6. Preparo da tripsina: 20 µg de tripsina em 1000 µL de bicarbonato de amônio 50 mM

gelado. Concentração final da tripsina 20 ng/ μ L.

7. Adicionar solução de tripsina (sugestão usar na proporção de 1:50 de enzima:substrato). Incubar de 16 a 20 h a 37 °C, com shake de 200 rpm, cobrir a bandeja do thermo shake com papel alumínio.

*Rapigest a 0,2% é preparado ao ser solubilizado em 500 μ l de bicarbonato de amônio 50 mM.

Dia seguinte

1. Adicionar TFA a 0,4% do volume total das amostras para parar a reação da tripsina. Verificar se o pH está aproximadamente 2, adicionar moderadamente mais TFA caso não esteja. Vortexar.

2. Incubar as amostras a 37 °C por 90 minutos.

3. Centrifugar as amostras a 14000 rpm, 6 °C por 30 minutos.

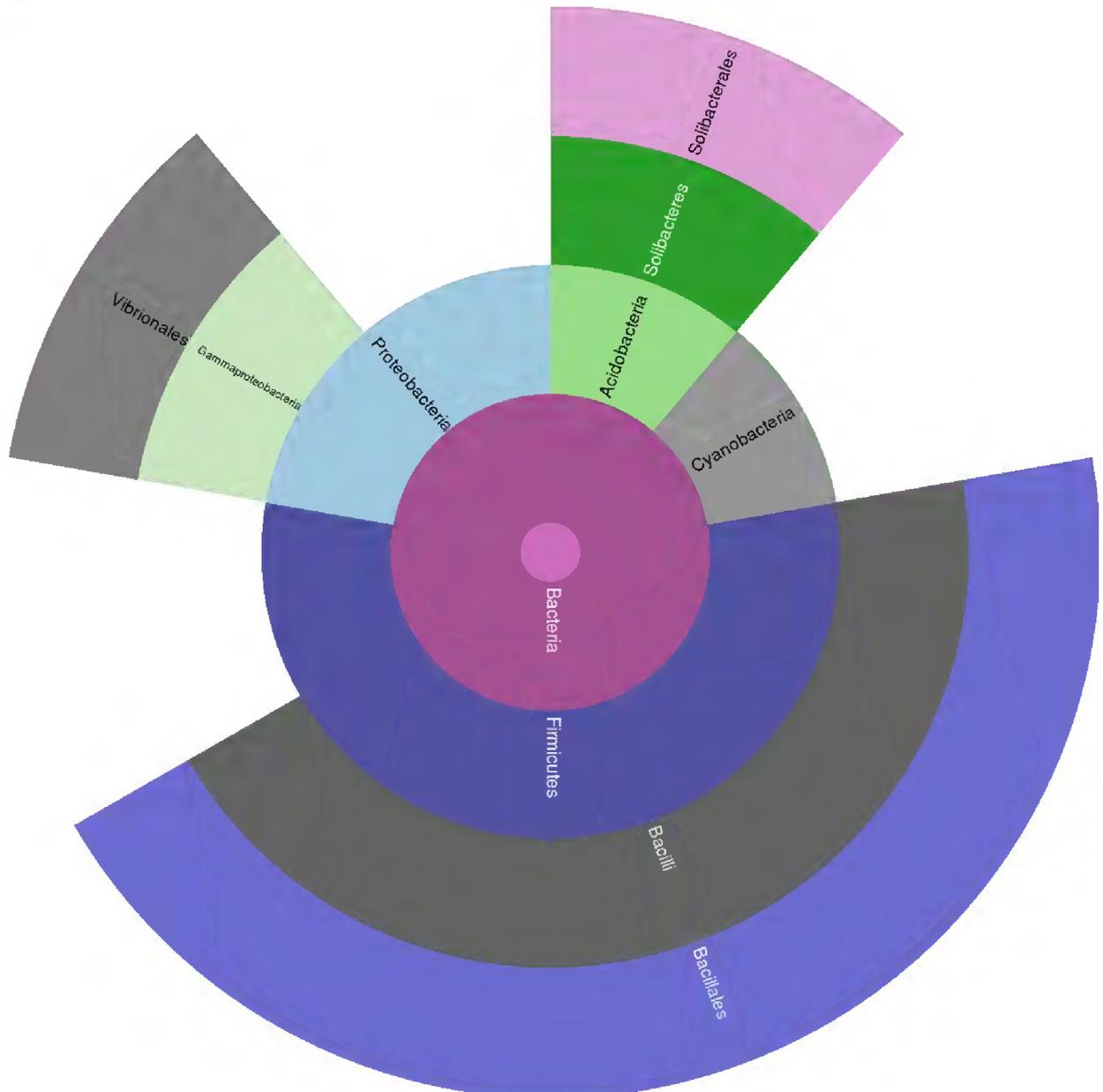
4. Transferir o sobrenadante para o vial.

5. Aumentar o pH adicionando 5 μ L de 1 N NH_4OH para elevar o pH até 10, adicionar moderadamente mais deste reagente caso o pH não esteja em 10.

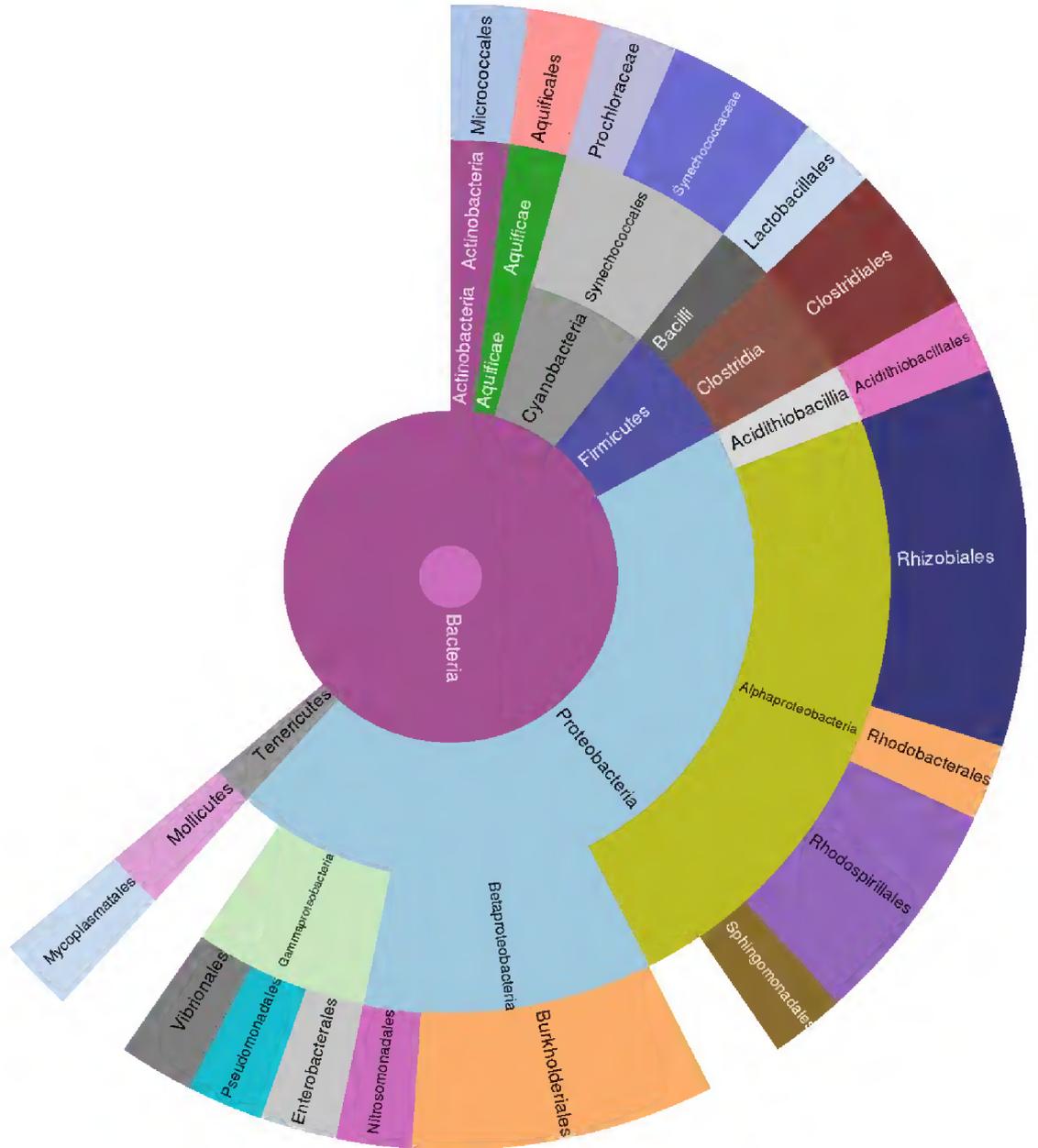
APÊNDICE C – Material Suplementar do Capítulo 2

Figura S1. Abundância relativa de peptídeos entre os filos, classes e ordem de bactérias (respectivamente, a partir do círculo central de “bactéria”), construído pelo software Unipept. Quanto maior a fatia do círculo, maior a quantidade de peptídeos. a) Solo Exposto; b) RAD Inicial; c) RAD Avançado 12; d) RAD Avançado 14; e) Solo Nativo

a)



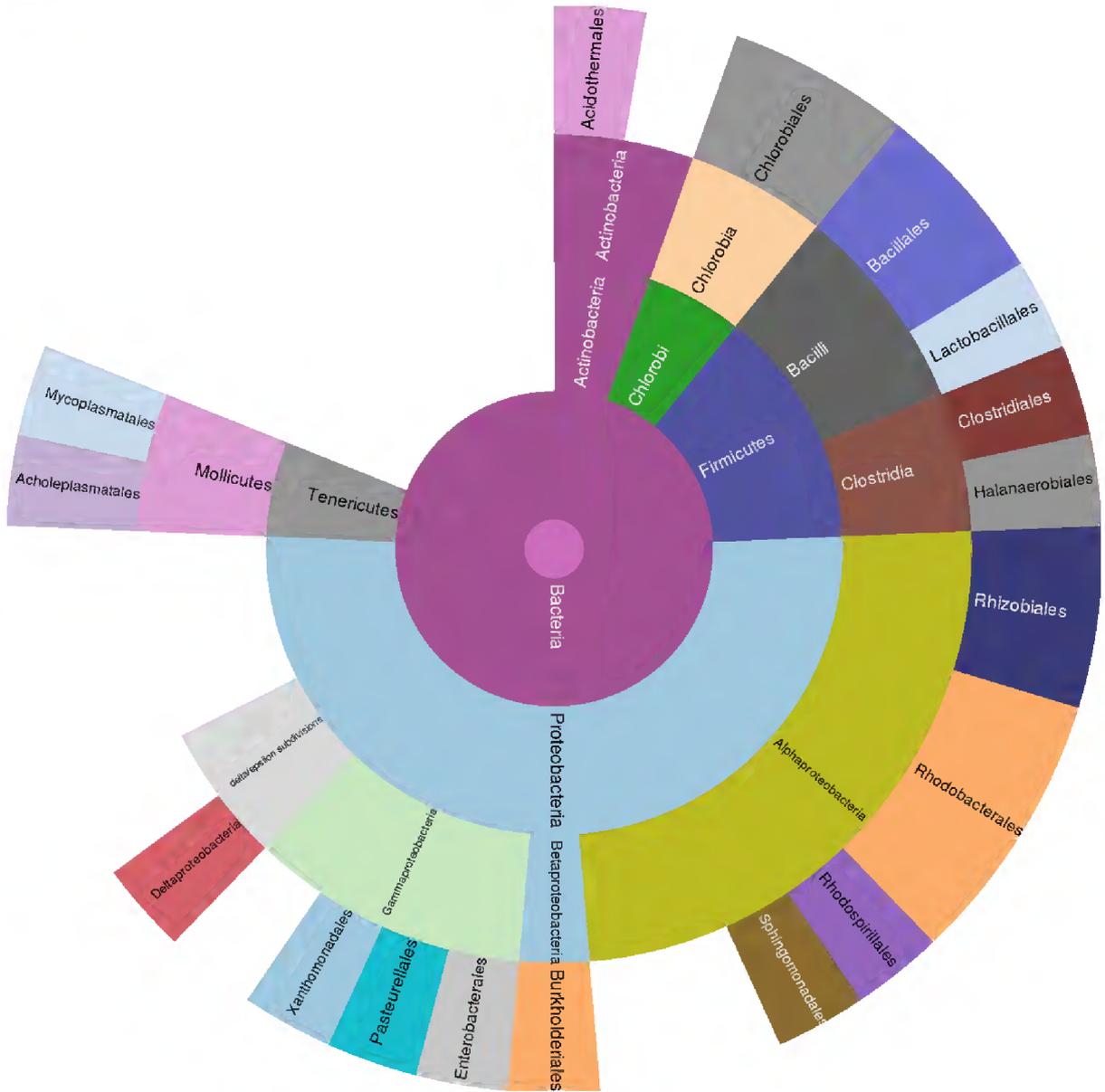
b)



c)



d)



e)



Tabela S1. Lista dos processos biológicos (níveis 2, 3 e 4) identificados entre as áreas em estudo, tabela construída com resultados do software OmicsBox. SE: Solo Exposto; RI: RAD Inicial; RA12: RAD Avançado 12 anos; RA14: RAD Avançado 14 anos; SN: Solo Nativo.

Áreas	Total de processos	Processos Biológicos
RA12 RA14 RI SE SN	66	cell differentiation reproduction mitotic cell cycle establishment of localization in cell intracellular transport organic substance metabolic process cellular process anatomical structure development signaling cell division biological regulation cellular component organization or biogenesis organic cyclic compound metabolic process lipid metabolic process response to stimulus cellular biosynthetic process protein localization biosynthetic process anatomical structure morphogenesis transport aging cellular aromatic compound metabolic process protein folding organic substance catabolic process heterocycle metabolic process small molecule metabolic process protein metabolic process response to stress protein-containing complex subunit organization signal transduction cellular component assembly anatomical structure formation involved in morphogenesis cellular component biogenesis nitrogen compound metabolic process developmental process cellular component morphogenesis cell communication developmental maturation organelle organization membrane organization

organonitrogen compound metabolic process
 macromolecule metabolic process
 regulation of biological process
 regulation of cellular process
 cellular macromolecule metabolic process
 macromolecule localization
 cell cycle
 cellular component organization
 cellular nitrogen compound metabolic process
 establishment of protein localization
 cellular localization
 cellular metabolic process
 organic substance biosynthetic process
 nucleobase-containing compound metabolic process
 growth
 catabolic process
 primary metabolic process
 metabolic process
 immune system process
 cellular catabolic process
 establishment of localization
 carbohydrate metabolic process
 cell wall organization or biogenesis
 cellular developmental process
 cellular response to stimulus
 localization
 RA12 RA14 RI SN 30 multicellular organismal process
 cell death
 multicellular organism development
 movement of cell or subcellular component
 regulation of biological quality
 cell-cell signaling
 system process
 nervous system process
 locomotion
 autophagy
 pigmentation
 symbiont process
 cellular macromolecule localization
 biological adhesion
 cell adhesion
 cellular amino acid metabolic process
 organic acid metabolic process
 secondary metabolic process

		interspecies interaction between organisms
		cell population proliferation
		mitotic cell cycle process
		chromosome segregation
		multi-organism process
		localization of cell
		embryo development
		cell motility
		process utilizing autophagic mechanism
		ribonucleoprotein complex biogenesis
		cell cycle process
		homeostatic process
RA12 RA14 SE	1	generation of precursor metabolites and energy
RA12 RI SN	1	cofactor metabolic process
SE	1	photosynthesis

Tabela S2. Número de proteínas identificadas relacionadas aos processos biológicos “Resposta ao Estresse (GO: 0006950)”, “Processo de Catabolismo (GO: 0009056)”, “Processo de Biossíntese (GO: 0009058)” ao longo da reabilitação. SE: Solo Exposto; RI: RAD Inicial; RA12: RAD Avançado 12 anos; RA14: RAD Avançado 14 anos; SN: Solo Nativo. Dados seguidos da mesma letra não diferem significativamente de acordo com o Teste de Tukey ($p < 0,05$).

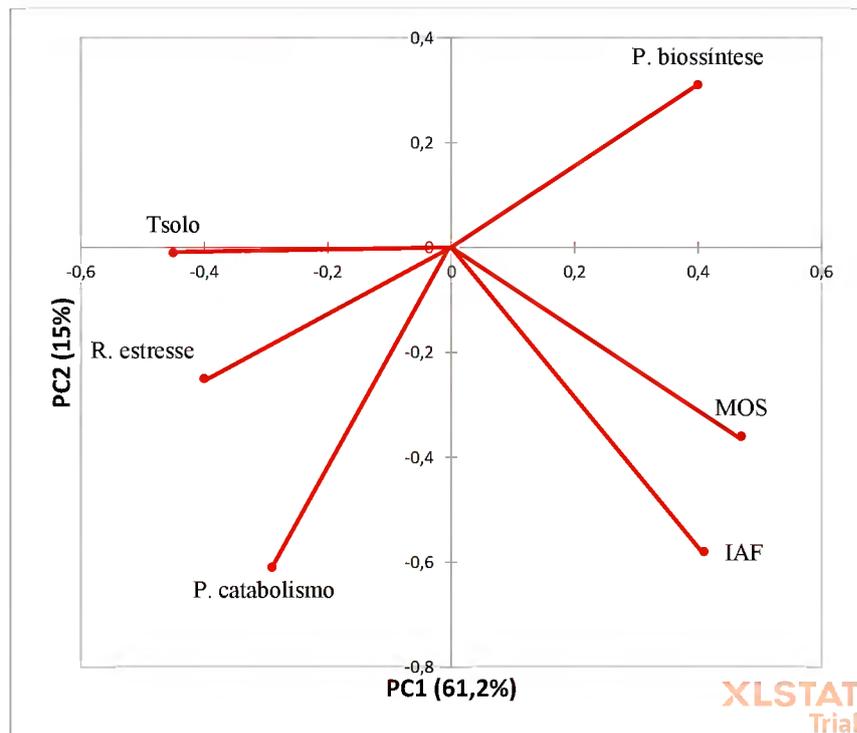
Área	Processo de biossíntese (%)	Processo de catabolismo (%)	Resposta ao estresse (%)
SE	27,20 ± 3,88 ^b	24,7 ± 16,7 ^a	33,0 ± 2,53 ^a
RI	55,02 ± 2,43 ^a	15,2 ± 3,65 ^a	29,4 ± 3,32 ^{ab}
RA12	57,77 ± 6,43 ^a	11,0 ± 0,5 ^a	24,7 ± 2,05 ^b
RA14	50,22 ± 7,51 ^a	14,5 ± 2,9 ^a	31,0 ± 1,39 ^{ab}
SN	48,03 ± 6,14 ^a	16,1 ± 1,21 ^a	25,8 ± 1,46 ^{ab}

Figura S2. a) Valores de correlação dos “loadings” com a PC1 e PC2. b) Plot de correlação dos “loadings” com a PC1 e PC2. c) Agrupamento hierárquico aglomerativo com os valores de “loadings” apresentados no item a).

a)

	PC1	PC2
M.O.	0.47	-0.36
IAF	0.41	-0.58
Tsolo	-0.45	-0.01
P. biossintese	0.40	0.31
R. estresse	-0.40	-0.25
P. catabolismo	-0.29	-0.61

b)



c)

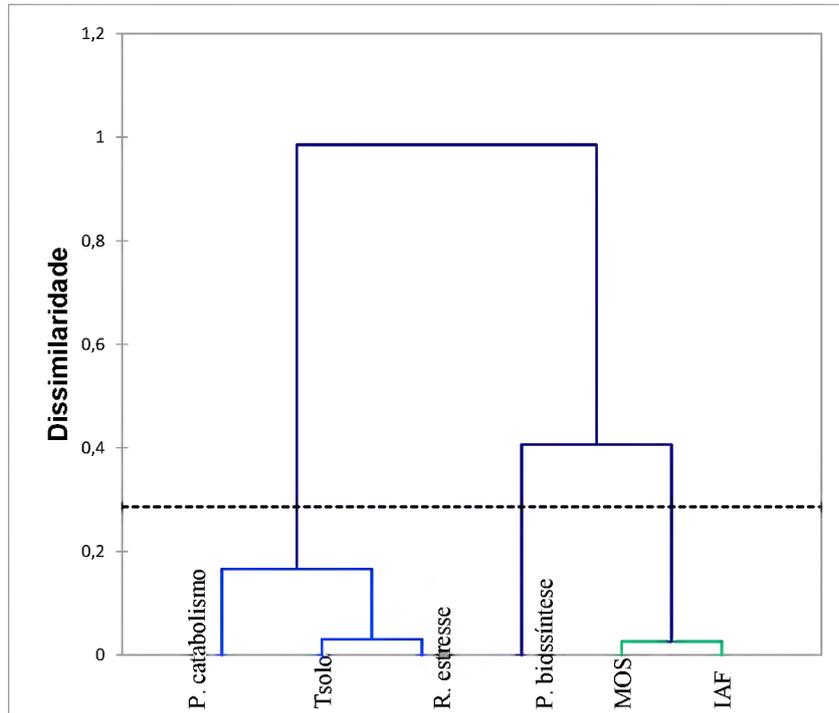


Tabela S3. a) Número de hidrolases e oxidoreduases identificadas entre as amostras. b) Correlação de Pearson dos valores médios de variáveis ambientais representativas de reabilitação com os valores de hidrolases e oxidoreduases apresentados. Asteriscos representam significância $p < 0.05$.

a)

Áreas	Hidrolases	Oxidoreduases
SE	2 ± 1	2 ± 1
RI	16 ± 9	5 ± 2
RA12	13 ± 5	5 ± 2
RA14	11 ± 5	6 ± 2
SN	16 ± 10	8 ± 4

b)

V. Ambientais	Hidrolases	Oxidoreduases
MOS	0,364	0,485
IAF	0,299	0,534*
Tsolo	-0,537*	-0,565*