

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Metagenoma De Comunidades Bacterianas Associadas Ao
Solo Do Bioma Pantanal Sul-mato-grossense

LUCCAS PEREIRA PIRES

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Agosto, 2019

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Metagenoma De Comunidades Bacterianas Associadas Ao
Solo Do Bioma Pantanal Sul-mato-grossense

Autor: Luccas Pereira Pires
Orientadora: Prof^a Dra. Alinne Pereira de Castro

"Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA, no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco - Área de concentração: Biotecnologia"

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Agosto, 2019

P667m Pires, Luccas Pereira

Metagenoma de comunidades bacterianas associadas ao solo do bioma Pantanal Sul-mato-grossense/ Luccas Pereira Pires; orientação Prof^a Dr^a Alinne Pereira de Castro.-- Campo Grande, MS : 2019.

55 f.: il.; 30 cm;

Dissertação (mestrado em Biotecnologia) - Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande MS, 2019

1. Bactérias - Solo. 2. Biomas - Pantanal (MT e MS).
3. Biodiversidade - Biotecnologia. I.Castro, Alinne Pereira de. II. Título.



**Metagenoma de Comunidade Bacterianas Associadas ao Solo do Bioma
Pantanal Sul- mato- grossense**

Autor: Luccas Pereira Pires

Orientadora: Profa. Dra. Alinne Pereira de Castro

TITULAÇÃO: Mestre em Biotecnologia
Área de concentração: Biotecnologia.

APROVADO em 23 de agosto de 2019.

Alinne Castro

Profa. Dra. Alinne Pereira de Castro – UCDB

Carina Elisei de Oliveira

Profa. Dra. Carina Elisei de Oliveira- UCDB

Fernando Silva Bernardes

Prof. Dr. Fernando Silva Bernardes- UFMS

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo agradeço a Deus por me proporcionar a vida e minha curiosidade, a qual me possibilita a chegar mais longe. Agradecer aos Salesianos de Dom Bosco que me mostraram como posso segui-Lo.

Agradeço a minha orientadora: Professora Drª. Alinne Castro não só por me ensinar tudo o que sabe sobre a vida da pesquisa, mas por me ensinar a como ser melhor frente ao estudo e as pessoas a minha volta. Que junto ao melhor “Biogrupo” de pesquisa incluindo: Natalí Calças, Fernanda de Cássia, Marcos Morales, Luiz Riquelme e Thais Maryelle, fizeram das paredes brancas um mural de vida.

Agradecer a minha família, a qual nunca entendeu como eu estudava, nunca entendeu minhas crises, mas sempre estavam ali para mim, me apoiando. Minha mãe, Lourdes, que por mais longe que eu estivesse, sempre soube como eu me sentia. Meu pai, Sérgio, que me sustentou, não pelo dinheiro perdido, mas a confiança investida. E isso ninguém paga.

Agradecer a minha psicóloga Dioene, pelos mais de 4 anos aturando e ajudando a me achar como pessoa.

Agradecer aos meus amigos de copa que por todas as reações erradas que eu tive, sempre tinha um café e uma boa risada para me fazer voltar.

Agradecer a todos que passaram por mim e me ajudaram nos meus estudos desde o começo da minha graduação, como os PIBICs com a

Professora Geisa Helmod e na Embrapa Gado de Corte com as Doutoras Karem Guimarães e Mariane Vilela.

Agradecer a Universidade Católica Dom Bosco (UCDB) que desde minha graduação se tornou meu segundo lar, e sempre me proporcionou uma estrutura impecável para poder realizar meu trabalho de pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES) e Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (Fundect) pelo apoio financeiro que tornou possível a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	5
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
RESUMO.....	11
ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO	13
Revisão de literatura	14
Pantanal – Planície Alagada.....	14
Habitantes do solo – Diversidade microbiana.....	16
Domínio bacteriana	19
Metagenômica – Uma Abordagem da Biologia Molecular	21
OBJETIVOS	23
Objetivo Geral	23
Objetivos específicos	23
MATERIAL E MÉTODOS	24
Coleta das amostras de solo	24
Análise Físico-químico das amostras de solo Pantaneiro.....	27
Extração de DNA	28
Quantificação do DNA das amostras de solo	28
Amplificação do gene 16S rDNA.....	28
Sequenciamento do DNA para Bactérias	28
RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
Coleta das amostras e analyses dos parâmetros físico-químicos	30
Extração de DNA metagenômico.....	33
Análise da comunidade microbiana do solo.....	35
Alfa e Beta diversidade da microbiota do solo	40
Conclusão e Perspectiva.....	48
REFERÊNCIAS	49

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Identificação e localidade das amostras de solos do Pantanal Sul Mato-grossense, região da Nhecolândia, nas áreas de inundação e reserva..	27
Tabela 2: Valores em porcentagem de umidade das amostras do solo, nos pontos da coleta de áreas de inundação e reserva, no Pantanal Sul-mato-grossense.....	30
Tabela 3: Propriedades físico-químicas das amostras de solo de áreas de inundação e reserva coletadas no Pantanal Sul-mato-grossense.....	32
Tabela 4: Quantificação das amostras de DNA extraídas de solos do Pantanal Sul-mato-grossense. Amostras de solo Inundado e de Reserva.	34
Tabela 5: Analise das sequências brutas processadas e filtragem de Quality Control (QC) a partir da análise de sequenciamento de metagenoma para área inundada, e área reserva, de ambos os <i>primers</i> sequenciados.	36
Tabela 6: Número estatísticos das sequências bacterianas de Shannon e Simpson, para amostras de solo do Pantanal, área inundada e reserva.	42

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Região da Nhecolândia no Pantanal Sul Matogrossense, onde foram realizadas as coletas das amostras de solos nas duas áreas selecionadas, inundada e reserva, pela equipe de trabalho. Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.....	24
Figura 2: Coleta das amostras de solos de área inundada no Pantanal Sul Matogrossense, nos pontos determinados.....	25
Figura 3: Coleta das amostras de solos de área reserva Pantanal Sul Matogrossense.....	25
Figura 4: Instrumentos, martelo de borracha e cano PVC, utilizados para coletar as amostras de solo no Pantanal, em Mato Grosso do Sul.....	26
Figura 5: Gel de agarose 0,8% de extração do DNA das amostras solos, área inundada e área reserva, do Pantanal. Disposto do marcador molecular 1Kb plus seguido SI1.1: Solo Inundado ponto 1; SI1.2: Solo Inundado ponto 2; SI1.3: Solo Inundado ponto 3; SR1: Solo de Reserva ponto 1; SR2: Solo de Reserva ponto 2; SR3: Solo de Reserva ponto 3.....	34
Figura 6: Gel de agarose 0,8% das amplificações, gene 16S rDNA, da extração do DNA das amostras solos, área inundada e área reserva, do Pantanal. A: Tamanho de fragmento esperado (1450pb) do gene 16S rDNA.	35
Figura 7 : Dendograma da análise de agrupamento com base na distância euclidiana para a comunidade de bactérias, região V3-V4, para amostras de solo do Pantanal, áreas inundadas (SI) e reserva (SR).....	37
Figura 8: Gráfico dos 10 gêneros bacterianos com maior abundância relativa nas áreas inundada e reserva de coletas na região Nhecolândia no Pantanal Sul-mato-grossense.....	39
Figura 9: Diagrama de Venn para as áreas inundada e reserva do Pantanal Sul-mato-grossense.....	41
Figura 10: A curva de rarefação com os números de OTUs bacterianas observadas por número de sequencias amostradas entre as áreas Inundadas (linha azul), e Reserva (linha vermelho).....	41
Figura 11: Análise de Coordenadas Principais (PCoA) das amostras bacterianas de solos do Pantanal. Essa análise foi baseada no agrupamento das matrizes de similaridade Unweight UniFrac não ponderada.....	43
Figura 12: Gráfico LDA, Biomarcadores bacterianos de solo do Pantanal.....	44
Figura 13: Proporção de abundância relativa referente a comunidade bacteriana (V3-V4) entre a área inundada, em azul, e reserva, em verde, sendo	

A para Filo e B para Classe. O gráfico demonstra primeiramente a proporção média de filos e classes bacterianas, a diferença nas proporções médias para cada grupo analisado e por último o *p*-value indicando se a proporção média é igual para uma determinada amostra..... 46

RESUMO

O bioma Pantanal é reconhecido nacional e internacionalmente pela exuberância de sua biodiversidade, como a fauna e flora, entretanto pouco se conhece sobre a diversidade e abundância da comunidade bacteriana presente no solo. Este bioma vem sofrendo com constantes preenchimentos de sedimentos, principalmente do Cerrado. Tal fato se traduz em alterações nas dinâmicas de inundações determinantes na biodiversidade do Pantanal. Entretanto, devido a estrutura do solo os estudos de diversidade e abundância de micro-organismos permanecem ainda restritos. Contudo, a utilização de técnicas moleculares, incluindo a abordagem metagenômica, tem-se mostrado promissora e tornando possível acessar a diversidade microbiana associadas a inundação no bioma Pantanal. Diante do exposto, esse estudo tem como objetivo caracterizar o perfil molecular da comunidade bacteriana de solos provenientes de áreas de inundação e reserva da região de Nhecolândia no Pantanal, Mato Grosso do Sul. Para tal, foram coletadas seis amostras de solos do Pantanal, sendo três amostras de solo da área inundada e três amostras de solo referente à área de reserva. Para avaliar a diversidade e abundância da comunidade bacteriana de solos, foi realizado a extração direta de DNA seguido por sequenciamento de DNA das regiões V3-V4 para o gene 16S rDNA. O estudo demonstrou uma diferenciação do comportamento do perfil taxonômico bacteriano entre as áreas do Pantanal, frente a presença de água, como o gênero *Pseudarthrobacter* e a classe Clostridia que houve um destaque ao apresentarem um aumento na sua abundância relativa em solos inundados, sendo revelados com biomarcadores de áreas que sofrem com essa dinâmica ambiental. Vale a pena ressaltar que à análise realizada no presente estudo também promove impulsos para novos trabalhos, como nas áreas de biorremediação e bioprospecção, na região pantaneira.

Palavras-chave: Comunidade Bacteriana; solo; Metagenômica; Bioma Pantanal.

ABSTRACT

The Pantanal biome is recognized nationally and internationally for the exuberance of its biodiversity, such as fauna and flora, however little is known about the diversity and abundance of the bacterial community present in the soil. This biome has been suffering from constant sediment fill, mainly from the Cerrado. This fact translates into changes in the dynamics of floods determining the biodiversity of the Pantanal. However, due to soil structure, diversity and abundance studies on microorganisms are still restricted. However, the use of molecular techniques, including the metagenomic approach, has been promising and making it possible to access the microbial diversity associated with flooding in the Pantanal biome. Given the above, this study aims to characterize the molecular profile of the bacterial community of soils from floodplain and reserve areas of the Nhecolândia region in the Pantanal, Mato Grosso do Sul. To this end, six samples of soils from the Pantanal were collected. three soil samples from the flooded area and three soil samples from the reserve area. To evaluate the diversity and abundance of the soil bacterial community, direct DNA extraction was performed followed by DNA sequencing from the V3-V4 regions to the 16S rDNA gene. The study showed differentiation of the behaviour of the bacterial taxonomic profile between the areas of the Pantanal, in front of the presence of water, such as the genus *Pseudarthrobacter* and the class Clostridia. biomarkers of areas that suffer from this environmental dynamic. It is noteworthy that the analysis performed in the present study also promotes impulses for new work, such as in the areas of bioremediation and bioprospecting, in the Pantanal region.

Keywords: Bacterial Community; soil; Metagenome; Pantanal biome.

INTRODUÇÃO

No Brasil compreende seis grandes biomas de interesse para a pesquisa devido apresentarem alta diversidade, tanto da fauna quanto da flora. Dentre esses biomas, o Pantanal se destaca além das espécies raras e endêmicas, mas também por ser conhecido por ser uma savana alagada, ou como região alagada do Cerrado. O Pantanal é reconhecido nacional e internacionalmente pela exuberância de sua biodiversidade. Apesar de ser um santuário com excelentes condições de conservação, esse bioma também é uma região sensível e vulnerável, tendo sua diversidade biológica cada vez mais ameaçada por atividade antropogênica. Estudos recentes vêm demonstrando que os principais rios, Paraguai e Taquari, estão sendo constantemente preenchidos por cargas significativas de sedimentos descarregados principalmente pelo desmatamento do Cerrado, ocasionando sérios problemas de assoreamento que, se traduzem em alterações nas dinâmicas de inundações. Essas inundações normalmente são de longa duração e ocorrem em aproximadamente 50% das áreas do Pantanal na maioria dos anos, o que afeta substancialmente os ecossistemas pantaneiros.

As inundações constituem um fenômeno ecológico limitado no tempo de duração e espaço que abrange no ambiente. Consequentemente o pulso de inundaçāo é vital para a vida no Pantanal, sendo o ciclo de cheia e seca determinante para toda a biodiversidade do Pantanal. Entretanto, pouco se conhece sobre a diversidade e abundância de comunidade bacteriana e fúngicas sob o efeito de alterados regimes de inundaçāo sazonal e do impacto de pastagens nas amostras de solo no bioma Pantanal.

Estudos que utilizam da abordagem metagenômica incluindo sequenciamento em larga escala de DNA, permitem o conhecimento mais preciso da comunidade microbiana sem cultivo prévio tendo em vista que grande parte desses micro-organismos permanecem desconhecidos e inexplorados. Uma vez que há poucos estudos de extrações de DNA do solo e as dificuldades em obter esse DNA, devido às propriedades físico-químicas do mesmo são

diversas entre os ambientes, se faz cada vez mais necessário o uso de ferramentas da Biologia Molecular. O estudo molecular unido a bioinformática nesse bioma é necessário e valoroso, visto que os micro-organismos presentes podem ser utilizados na área de bioprospecção, biorremediação, como bibliotecas genômica e enriquecimento para banco de dados futuros.

Revisão de literatura

Pantanal – Planície Alagada

Tombado como Patrimônio Nacional pela Constituição Federal, o Pantanal considerado uma das maiores regiões alagadas, enquadrada no quesito pântano, do mundo, possuindo características naturais intrínsecas. Além de ser reconhecido nacional e internacionalmente pela sua biodiversidade, sendo um santuário preservado, repleto de água, com belas paisagens formadas por rios, lagoas e uma grande variedade de animais e plantas (CARDOSO, 2008) (MIRANDA *et al.*, 2018). O Pantanal possui como característica que é ser um compilado por vários deltas internos pequenos, tendo como o maior deles o delta interno que origina do Rio Taquari. Este complexo do Pantanal está localizado entre os estados brasileiros Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, ocupando cerca de 2% da área brasileira, além de também englobar o norte do Paraguai e leste da Bolívia (NUNES DA CUNHA *et al.*, 2015).

Por ser formado de complexas características o bioma Pantanal gera discussões sobre sua denominação. O Instituto nacional de Tecnologia em Áreas Úmidas (INAU) delimita e classifica o Pantanal como uma Área Úmida (AU) na Classificação e delineamento das áreas úmidas brasileiras e de seus macro habitats (NUNES DA CUNHA *et al.*, 2015) com tais características descritas por Nunes da Cunha e seus colaboradores em 2011 e algumas alterações em 2013 por Junk e colaboradores, que descreve também, o Pantanal, com uma Savana (Cerrado) inundável.

A maior das AUs do mundo está no Brasil, sendo 20% o Pantanal das AUs brasileiras (JUNK *et al.*, 2011). O Pantanal compreende, dos seus 150.000 Km², a maior parte com cerca de 130.000km² no Brasil, em Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. E obtém destaque a região de Nhecolândia, Mato Grosso do Sul,

que nos serviços ecossistêmicos, biodiversidade e considerações culturais de AUs, detém cerca da metade dos valores (em US\$ ha⁻¹ a⁻¹) por aprovisionarem serviços a sociedade da região, mesmo tendo uma baixa fertilidade do solo, tornando este mais vulnerável ao impacto humano (NUNES DA CUNHA *et al.*, 2015).

Devido sua localização e extensão, o complexo do Pantanal possui uma posição geográfica estratégica favorecendo o contato com outros biomas brasileiros, como a Amazônia e principalmente o Cerrado. Esse contato próximo faz com que a planície pantaneira abrigue uma grande concentração de vida silvestre, e consequentemente favorecendo na sua diversificação (MERCANTE *et al.* 2011) (JUNK *et al.*, 2011).

No Pantanal já foram catalogadas pelo menos 463 espécies de aves, 177 de répteis, 124 de mamíferos, 325 espécies de peixes de água doce e 3.500 de plantas. Destas espécies de vegetais as denominadas lenhosas, com aproximadamente 750 espécies, e herbáceas, com cerca de 1150 espécies, são utilizadas como característica de elucidação das diversas fisionomias de AUs, incluindo o Pantanal, pois são diferentemente encontradas nas áreas de inundação (palustres) e não inundáveis (JUNK *et al.*, 2006). Entretanto, vale a pena mencionar que, esses números refletem apenas uma visão geral sobre a biodiversidade ainda pouco estudada da região pantaneira (POTT *et al.* 2011) (ALHO E SABINO, 2011).

Estima-se que mais de 80% do bioma Pantanal apresente excelentes condições de conservação, o qual abriga espécies de mamíferos e aves que, em contrapartida, estão praticamente extintas em outros estados brasileiros, como por exemplo, a arara-azul-grande (*Anodorhynchus hyacinthinus*) (MERCANTE *et al.* 2011).

Esse alto valor de preservação das áreas nativas do bioma Pantanal se deve em grande parte as inundações sazonais no seu território e a baixa fertilidade dos solos. Essas características naturais impediram a ocupação humana, o avanço da fronteira agrícola e o uso intensivo dos solos quando comparado ao bioma Cerrado, por exemplo, (ALHO, 2011). O bioma Pantanal é considerado uma das 37 últimas Grandes Regiões Naturais da Terra.

Apesar do alto nível de conservação, o bioma Pantanal também é uma região sensível e vulnerável, tendo sua diversidade biológica cada vez mais ameaçada. A pesca, a atividade pecuária e o turismo sem controle representam

ameaças constantes. Estudo realizado em 2005, sobre o levantamento da situação atual da cobertura vegetal natural da Bacia do Alto Paraguai (BAP) e do Pantanal brasileiro, alertou para o risco de desaparecimento da vegetação original do Pantanal nos próximos 45 anos (HARRIS *et al.* 2005).

Entretanto, a maior parte das ameaças está relacionada com o desmatamento do Cerrado. Os principais rios do Pantanal nascem nos planaltos e nas chapadas desse bioma vizinho, o qual sofre profundos problemas ambientais associados à intensa produção agrícola e pecuária. Diversos estudos vêm alertando que os desmatamentos que ocorrem indiscriminadamente no planalto adjacente do Pantanal, causam impactos de escala regional ou local nesse bioma. Essas alterações podem ser diretamente responsáveis em afetar o equilíbrio desse ecossistema, incluindo alterações nas mudanças climáticas, nas mudanças na composição química da atmosfera ou nas mudanças no ciclo hidrológico (Desmatamento na bacia do Alto Paraguai no Brasil) (ALHO, 2011). Dentre esses, o grande obstáculo é o intenso assoreamento, causado pelo desmatamento e consequente erosão do solo nas propriedades de lavouras e pastos, que ocupam a cabeceira dos rios no entorno do Pantanal. Com o avanço das inundações, desde aproximadamente 1976, a planície pantaneira vem sofrendo pelo intenso assoreamento, resultando em sérios efeitos econômicos, sociais e ambientais (MIRANDA *et al.*, 2018).

Habitantes do solo – Diversidade microbiana

Diversos estudos procuram mostrar o potencial econômico das espécies nativas do bioma Pantanal, para desta forma, tentar minimizar os impactos na sua ocupação e assim, propor uma alternativa para o aproveitamento sustentável na região (GUIMARAES *et al.*, 2000) (HYLANDER *et al.*, 2000). Apesar de todo esse esforço para catalogar a diversidade presente no bioma Pantanal, o conhecimento sobre a estrutura das comunidades microbianas presente nos solos ainda permanecem ausentes. Além disso, pouco se sabe sobre as consequências desses impactos frente a comunidade microbiana e o que reflete na função desse ecossistema. A inexistência desse estudo pode ser relatada devido à restrição do bioma, como difícil acesso as áreas do Pantanal, delimitação do espaço a ser estudado e a própria dificuldade de estudo dos micro-organismos em solos.

O solo não é um ambiente único; em vez disso, o solo abrange uma extensa variedade de diferentes habitats microbianos. Estes incluem a rizosfera (associados a raízes de plantas), zona fótica (expostas a luz), drilosphere (caminho de minhocas) e solo encontrado em caminhos preferenciais de fluxo de água, incluindo rachaduras no solo. Além disso, existem microambientes associados a agregados do solo, assim como, as condições encontradas em superfícies agregadas ou nos filmes de água entre agregados, sendo possível apresentar distintas condições dentro de agregados. Estudos demonstram interação acentuada quanto comunidades microbianas e nas condições abióticas com a profundidade do solo. Os principais parâmetros do solo, como pH, concentração de carbono orgânico, salinidade, textura e concentração de nitrogênio disponível, podem variar consideravelmente em diferentes profundidades do solo (FIERER, 2017).

Os micro-organismos têm papel direto e fundamental para a formação e biogênese do solo, manutenção da estrutura e fertilidade do solo e os processos de ciclos biogeoquímicos, bem como para outras funções do ecossistema, essenciais para o crescimento e a biorremediação das plantas (BALDRIAN, 2011). Os ciclos biogeoquímicos demonstram os diversos microrganismos que atuam em um mesmo ciclo, como por exemplo, na ciclagem do nitrogênio de acordo com a característica do solo (ESPENBERG, 2018). Para prever os efeitos das mudanças ambientais nesses serviços ecossistêmicos, é necessária uma compreensão abrangente de como os fatores bióticos e abióticos conduzem a composição das comunidades microbianas no solo. (LLADÓ, 2018). Entretanto, como o solo, com diferentes características que afetam as comunidades microbianas em diferentes graus. Os microrganismos não são distribuídos homogeneamente em ambientes complexos (LOMBARD, 2011).

O solo proporciona essa alta variabilidade genética de micro-organismos devido a sua extrema complexidade de propriedades físicas e químicas. Como os fatores abiótico, tais como: pH, disponibilidade de nutrientes, umidade e granulometria (BAKER *et al.*, 2009) (DECHESENE *et al.*, 2010) (ROUSK *et al.*, 2010). E mesmo biológicas, fator biótico, como: competição, predação ou parasitismo (CLARHOLM, 1981) (WRIGHT *et al.*, 1993) (TORSVIK *et al.*, 2002) (FRANKLIN & MILLS, 2003). No aspecto global, os solos atuam, por exemplo, estocando grande parte do carbono do planeta (duas vezes mais o que existe na atmosfera), tamponando e filtrando grande parte dos poluentes (O'DONNELL,

2000). Despontam que concentrações elevadas de CO₂ e O₃ podem comprometer a capacidade dos solos de degradar poluentes orgânicos, este feito foi associado a uma mudança na estrutura da comunidade microbiana do solo (AI, 2018), sendo considerado um dos principais mediadores dos ciclos biogeoquímicos (BALDRIAN, 2011).

A estrutura do solo depende da associação entre as partículas minerais (areia, silte e argila) e matéria orgânica, no qual agregados de diferentes tamanhos e estabilidade são formados (GOEDERT, 1985). A organização estrutural das partículas do solo produz um *habitat* complexo e heterogêneo para os microrganismos caracterizados por diferentes substratos, nutrientes, concentração de oxigênio, conteúdo de água e valores de pH (LADD *et al.*, 1996; REN, 2018; ESPENBERG, 2018). O estado agregado do solo possibilita a formação de poros na matriz permitindo a existência de ar e água essenciais às suas funções biológicas.

O solo se distingue de outras formações geológicas por possuir atividade biológica, devido principalmente, à diversidade de microrganismos que nele existe (VARGAS HUNGRIA, 1997). De fato, os microrganismos constituem uma interface biológica com os ambientes físicos e químicos da Terra, seja atuando diretamente em processos como a mineralização da matéria orgânica ou indiretamente, através de simbioses como na fixação de nitrogênio (O'DONNELL, 2000).

Além de estarem associados diretamente com a vegetação que pode ajustar suas comunidades microbianas radicular na infecção por patógenos e especificamente recrutar um grupo de microrganismos benéficos indutores de resistência a doenças e promotores de crescimento, com isso maximizando potencialmente a chance de sobrevivência de seus descendentes que crescerão no mesmo solo (ROELAND, 2018), quanto em plantações, frente aos resíduos lançados no solo (SHEN, 2018).

As dificuldades que inviabiliza as informações pode ser sugerida pelo fato de que os solos são considerados um dos materiais mais desafiadores para análises da Biologia Molecular, por apresentarem variações em suas composições físico-químicas (LOMBARD, 2011). Essa complexidade estrutural, com a conexão dos aspectos geográficos, geológicos, hidrológicos, climáticos, faunístico e florístico e além das atividades antropogênicas, de cada ambiente

pode apresentar uma peculiaridade frente a sua comunidade microbiana (FIERER *et al.*, 2012).

Domínio bacteriana

Compondo o grupo de maior espécie de organismos no planeta Terra, as bactérias, vem sendo o alvo de estudos exaustivos. (CHU *et al.*, 2010). Entretanto, a maioria dos táxons bacterianos permanecem desconhecidos ou inexplorados. As novas técnicas de biologia molecular, utilizando o gene do ribossomo bacteriano, vem auxiliando a desvendar esses micro-organismos em ambientes naturais (LYNCH & NEUFELD, 2015) (O'BRIEN *et al.*, 2016).

A estrutura das comunidades microbiana é fundamental na mediação dos ciclos biogeoquímicos no ambiente, demonstrando os inúmeros repertórios de espécies dominantes no solo. Tornando-se uma componente chave em ecossistemas naturais e controlados. (FIERER, 2017).

O solo agregado intervém mediante sua estrutura os ambientes intra-agregados e inter-agregados e superfície versus horizontes mais profundos do solo. Promovendo a modulação de suas concentrações abióticas, tal como a de oxigênio, que podem variar de 20% a <1%, de fora para dentro de agregados individuais do solo com apenas alguns milímetros de distância, provocando comunidades bacterianas encontradas próximas a uma raiz de planta a diferir extraordinariamente daquelas encontradas em ambientes de solo “a granel” a apenas alguns centímetros de distância. (SEXSTONE *et al.*, 1985) (PHILIPPOT *et al.*, 2013). As abundâncias relativas das principais taxas bacterianas encontrados na comunidade microbiológica do solo podem variar consideravelmente dependendo do solo em questão. Inclusive mesmo se as amostras de solo forem coletadas de locais onde a amostragem a poucos centímetros de distância (O'BRIEN *et al.*, 2016). Essa oscilação da comunidade microbiana pode ser explicada pela variação espacial no ambiente do solo e às características específicas do local de amostragem. As vertentes bióticas e abióticas podem confundir as avaliações das pesquisas e atrapalhar o entendimento com as demais. Por isso os novos estudos com micro-organismos utilizam o pH como a melhor vertente para predizer as comunidades bacterianas; entretanto, vale a pena ressaltar que não há um único fator que possa ser

determinante para a diversidade de micro-organismos em solos (LAUBER *et al.*, 2009) (GRIFFITHS *et al.*, 2011).

As bactérias podem apresentar relações independentes e de interações entre si, além dos fatores ambientais que estão submetidas. Tais relações diferenciadas entre o meio ambiente e comunidades microbianas podem influenciar a importância da estrutura da comunidade microbiana para explicar os processos no nível do ecossistema, frente aos ciclos de carbono e nitrogênio. Sendo que uma melhor compreensão das comunidades microbianas cientes por princípios ecológicos pode aumentar a capacidade de prever as taxas de processo bioquímicos do ecossistema em relação a avaliações baseadas em variáveis ambientais e fisiologia microbiana. (GRAHAM *et al.*, 2016).

Os fatores bióticos podem promover uma sobrevivência bacteriana e o seu crescimento no ambiente em solo muitas vezes, severamente, limitada. Com o alto grau de competição com outras bactérias do solo, como exemplificado pela ocorrência da produção de antibióticos e a própria resistência a antibióticos bacterianos do solo. Além da predação por minhocas e uma distribuição desigual de recursos no espaço e no tempo. Fatores como as perturbações frequentes no ambiente, como eventos de secagem-umidificação e congelamento-descongelamento, também proporcionam uma sobrevida limitada, mas peculiar ao ambiente inserido (KUZYAKOV & BLAGODATSKAYA, 2015). Essa sobrevivência causa certo desconforto nas linhas de pesquisa, pois quando o solo é artificialmente inoculado com numerosas bactérias, a maioria dessas bactérias provavelmente não persistem no solo por longos períodos de tempo (ACEA *et al.*, 1988) (BASHAN *et al.*, 2014). Pesquisas sugerem que a superfície do solo há restrições, bióticas ou abióticas, na colonização microbiana. Trazendo dados consideráveis de inatividade por parte dos micro-organismos encontrados no solo, e demonstrando que a biomassa microbiana representada por micro-organismos pode estar inativa em até um dado momento dependente do fator por ela exposta, tendo oscilação nos períodos de ativação e dormência. Mas a comunidade microbiológica não esbanja mais de 5% dos organismos ativos sem o substrato (BLAGODATSKAYA & KUZYAKOV, 2013).

Contudo há ampla influência desempenhada pela dinâmica da comunidade e pelas interações bióticas. Demonstrando como a dependência da densidade e as principais interações bióticas, como competição e predação, podem

determinar o grau em que os micro-organismos regulam os ciclos biogeoquímicos do solo. (BUCHKOWSKI *et al.*, 2017).

Metagenômica – Uma Abordagem da Biologia Molecular

Considerando a importante participação da comunidade bacteriana e fúngicas em ciclos biogeoquímicos nos solos, a grande diversidade genética apresentada por estes micro-organismos e a ausência de pesquisas sobre a adaptação dessa comunidade ao impacto de regimes de inundação sazonal no bioma Pantanal, torna-se necessário estudos moleculares mais detalhados. Nesse contexto, técnicas independentes de cultivo vêm permitindo analisar a existência de uma vasta diversidade de micro-organismos até então não acessada pelos métodos tradicionais dependentes de cultivo (TORSVIK *et al.*, 1990).

O termo metagenômica se refere a uma abordagem independente de cultivo baseada na investigação das moléculas de DNA de uma mistura de populações microbianas, ou seja, é baseado na análise genômica de DNA microbiano extraído diretamente de amostras ambientais (HANDELSMAN *et al.*, 1998). Sendo assim, se caracteriza por contornar a necessidade de cultivo e, em função da vasta diversidade microbiana, ser conduzida em grande escala (HANDELSMAN *et al.*, 2004).

As informações obtidas a partir da análise metagenômica podem ser usadas para determinar a diversidade taxonômica de uma comunidade, a presença de micro-organismos específicos, bem como determinar quais micro-organismos são dominantes em um determinado ambiente (HANDELSMAN *et al.*, 2004). A ausência de estudos sobre as comunidades bacterianas no Pantanal, destacando o desconhecimento perante o impacto inundação, torna-se cada vez mais plausível este presente estudo. Inclusive por que estudos atuais, da interferência de regimes d'água tem o papel ascendente do processo determinístico nas assembleias de estruturas e funções comunitárias microbianas em áreas úmidas. Além de revelar a discrepância entre as estruturas dos microrganismos, tanto bactérias quanto fungos, e as suas funções ecológicas em resposta aos gradientes do nível de água, e uma função ecológica relativamente estável ajudou a manter a função do ecossistema do Pantanal a partir de uma perspectiva de longo prazo (MA *et al.*, 2018). Por isso, essa

abordagem representa uma poderosa ferramenta para avaliar a influência do impacto dos regimes de inundação, na comunidade microbiana em amostras de solo do bioma Pantanal.

Esse conhecimento pode expandir nossa compreensão de como essas comunidades bacterianas e fúngicas que toleram as condições extremas relacionadas ao estresse ambiental e quais seriam suas potências para responder às mudanças climáticas futuras. Dessa maneira, estudos demonstram que solos o qual sofrem e/ou sofreram algum tipo de perturbação podem conter diferenças acentuadas tanto em sua taxonomia quanto seu perfil funcional. Dentre esses, a microbiota associada ao solo é identificada no equilíbrio posterior a perturbação contrapondo o perfil anterior. Isto é, a comunidade microbiana apresenta a capacidade de se reestruturar frente a diversidade funcional, entretanto a diversidade taxonômica não corresponde a taxa de crescimento anterior a perturbação, ou seja, o perfil taxonômico nos tempos anterior e posterior são diferentes, contudo o perfil funcional é semelhante, destacado a partir de um referencial de organismos maiores, que tendem a ter um equilíbrio semelhante ao anterior a perturbação, como no reino animália. Mostrando que a comunidade microbiana se comporta de forma díspares quando se trata das características taxonômicas e funcionais. Com isso, o estudo de solo pode ser um inovador acessório para a ecologia, utilizando-se de uma ecologia microbiana, o qual pode ser empregado nos ciclos biogeoquímicos frente a solos que precisam ser processados os compostos necessários, ou até a fixação de poluentes (CHOI *et al.*, 2017).

A potencialização de estudos com solo pode auxiliar principalmente com a construção de novas técnicas de confirmação dos solos afetados por perturbações e até a própria restauração do solo. Como a pesquisa em campos de agricultura demonstra altos impactos frente a diversidade taxonômica e funcional, o qual possuem disparidade destas características, trazendo o novo tratamento do solo com misturas certas de microrganismos essenciais, em uma amostra de solo, assim poder mistura-la ao solo impactado pela agricultura, e possivelmente reabilitar a funcionalidade do solo (SOUZA *et al.*, 2016).

Novos estudos utilizando a abordagem metagenómica de solos discutem principalmente para baixa eficiência de se trabalhar os dados gerados pelas etapas de bioinformáticas. Os pré-filtros, a normalização digital e o fracionamento, podem permitir que os executores de downstream se

concentrem em um melhor diagnóstico dos dados, tanto de baixa cobertura de amostras quanto de alta variabilidade de uma amostra, sem que haja uma forte consideração de mais recursos computacionais, como outros softwares e tempo de processamento. Com isso, essa capacidade deve permitir uma melhoria significativa das técnicas de montagem do metagenoma no futuro e fornecer as referências críticas que permitirão futuras investigações de solos e outros ambientes complexos (HOWE *et al.*, 2014).

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Identificar e comparar os perfis de metagenômicos das comunidades bacterianas de solos provenientes de áreas de inundação e reserva, na região de Nhecolândia, no Pantanal Sul Matogrossense.

Objetivos específicos

- Avaliar os parâmetros físico-químico das amostras de solos provenientes de áreas de inundação e reserva, na região do Pantanal Sul Matogrossense;
- Determinar as sequencias das regiões V3-V4 (bactéria) do DNA metagenômico extraído das amostras de solos provenientes de áreas de inundação e reserva, na região do Pantanal Sul Matogrossense;
- Classificar quanto a sua taxonomia as sequências de DNA das amostras de solos provenientes de áreas de inundação e reserva, na região do Pantanal Sul Matogrossense;
- Determinar a abundância relativa e diversidade taxonômica da comunidade bacteriana, frente aos diferentes parâmetros físico-químicos das áreas inundada e reserva das amostras de solos da região do Pantanal Sul Matogrossense.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras de solo

As coletas de solos foram conduzidas na Fazenda Alegria na sub-região da Nhecolândia, Pantanal Sul-mato-grossense (Figura 1) de acordo com os pontos geográficos na tabela 1 em julho de 2016, logo após o período de cheia, início do período da seca. Foram selecionadas duas áreas, sendo frente ao impacto sofrido incluindo a área de inundação sazonal (Figura 2), e uma área de reserva (Figura 3), que de acordo com Barbiero e colaboradores (2002) são descritas como vazante e cordilheira, respectivamente.

A área amostrada proveniente de inundação é caracterizada por estar inundada em 50% do ano, são como canais naturais de escoamento lento da água. E as amostras provenientes da área reserva foram coletadas nos pontos de 50m adentro da cerca de contenção do gado. A área de reserva é dominada por conter cobertura vegetal, típica do Cerrado *sensu stricto*.

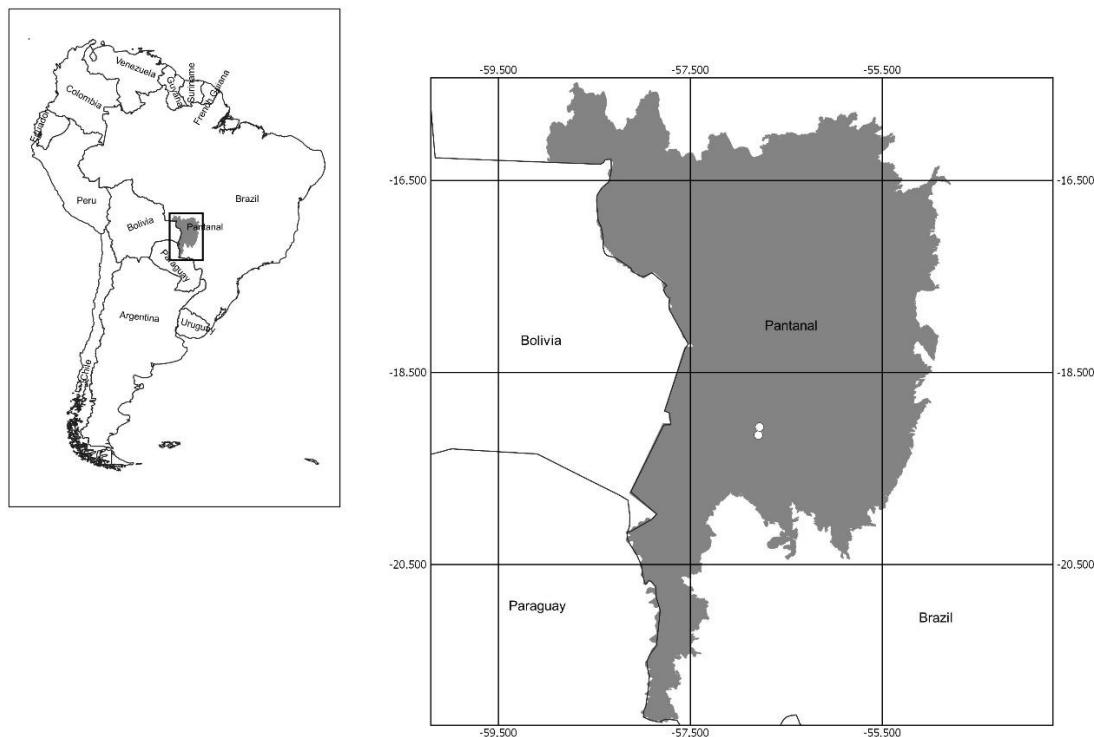


Figura 1: Região da Nhecolândia no Pantanal Sul Matogrossense, onde foram realizadas as coletas das amostras de solos nas duas áreas selecionadas, inundada e reserva, pela equipe de trabalho. Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.



Figura 2: Coleta das amostras de solos de área inundada no Pantanal Sul Matogrossense, nos pontos determinados.



Figura 3: Coleta das amostras de solos de área reserva Pantanal Sul Matogrossense.

Os pontos foram demarcados considerando as variações espaciais (gradiente topográfico) dentro da área. A amostragem para a coleta de solo foi composta por três amostras para cada área, inundada e reserva, totalizando seis amostras coletadas do solo Pantaneiro. Preservando uma distância de aproximadamente 100 metros entre cada ponto de coleta. Para cada amostra foi retirado 10 frações aleatoriamente em uma área de 1 m², e posteriormente foram misturadas, afim de manter maior homogeneidade do solo, sendo realizado para cada um dos pontos de coleta.

Cada fração foi coletada com o auxílio de um cano de PVC com a profundidade de 10 cm no solo e um raio de 2,5 cm (Figura 4). Posteriormente o solo foi peneirado (2 mm de diâmetro) para remoção de partículas grandes. Posteriormente, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis.

Após a coleta, o material foi mantido em isopor com gelo até chegar ao laboratório de Biologia Molecular da S-Inova na Universidade Católica Dom Bosco e armazenados a -20º C.

As amostras de solo foram identificadas de acordo com a área e ordens dos pontos que foram coletadas e com as localizações geográficas dispostas na tabela abaixo (tabela 1). Sendo utilizado na identificação da letra “S” para solos, as letras I e R para as áreas de coleta: inundado e reserva respectivamente.



Figura 4: Instrumentos, martelo de borracha e cano PVC, utilizados para coletar as amostras de solo no Pantanal, em Mato Grosso do Sul.

Tabela 1: Identificação e localidade das amostras de solos do Pantanal Sul Mato-grossense, região da Nhecolândia, nas áreas de inundação e reserva.

Áreas do Pantanal	Ponto	Nome	Grau	Longitude	Latitude
Solos Inundado	1	*SI.1	21	521939	7882412
	2	*SI.2	21	521914	7882362
	3	*SI.3	21	521974	7882210
Solos reserva	1	**SR.1	21	523185	7891573
	2	**SR.2	21	523231	7891559
	3	**SR.3	21	523275	7891538

*SI.(__): Solo Inundado seguido do número da amostra; **SR.(__): Solo Reserva seguido do número da amostra.

Análise Físico-químico das amostras de solo Pantaneiro

A umidade do solo foi determinada segundo o cálculo de unidade gravimétrica descrito pela Embrapa (1997). Resumidamente, a amostra de solo foi transferida para um cadinho, com peso previamente conhecido e transferida para estufa a 105-110°C, deixando nesta condição durante 24 horas. Após esse período de incubação as amostras foram retiradas da estufa e colocadas em dessecador, por 10 min, até esfriar, e pesar novamente o cadinho.

A Análise Físico-químico das amostras de solo do Pantanal Sul-mato-grossense foi determinada pela empresa SIAL SOLO - Análises Laboratoriais Ltda. Para a devida análise foi promovido um mix entre os solos de cada área, determinado, então, dois amostras, separadas pela área, sendo uma para o solo inundado e a outra para o solo de reserva.

Extração de DNA

A extração direta de DNA da comunidade microbiana presente nas amostras de solo, sendo três réplicas biológicas da área inundada e três réplicas biológicas da área de reserva, foram extraídas utilizando o Kit de extração de DNA para solos da Qiagen, *DNeasy PowerSoil Kit*, seguindo as indicações do fabricante.

Quantificação do DNA das amostras de solo

A quantificação do DNA das amostras de solos do Pantanal, três réplicas biológicas para as amostras de solo Inundado e três réplicas biológicas para as amostras de Reserva, foi realizado via Qubit® 3.0 Fluorometer da Thermo Fisher (Life Technologies), seguindo as normas determinadas pelo fabricante.

Amplificação do gene 16S rDNA

Para hibridização da região conservada do gene 16S rDNA, foi utilizado o par de oligonucleotídeos 27F [5'- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'] (LANE, 1991) e 1492R [5'- GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'] (TURNER; PRYER; MIAO; PALMER, 1999) o qual flanqueiam as regiões do domínio bactéria gerando um fragmento de aproximadamente 1450pb. Os fragmentos dos genes do 16S rDNA amplificados via reação em cadeia da polimerase (PCR), seguindo o protocolo de tampão da PCR: 1X de tampão da Taq polimerase (Invitrogen); 3,0 mM de MgCl₂; 5 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,25 mM de dNTPs; 1,0U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) com volume final da reação 20 µl ajustado com H₂O MiliQ. O ciclo da reação foi realizado com desnaturação inicial de 3 min a 94 °C, seguido por 35 ciclos com desnaturação por 30 segundos a 94 °C, anelamento por 60 segundos a 50 °C e por último, extensão por 90 segundos a 72 °C, seguido por uma extensão final de 7 minutos a 72 °C e resfriamento a 4°C.

Sequenciamento do DNA para Bactérias

O DNA extraído foi submetido o sequenciamento de DNA em larga escala, pela empresa GenOne Soluções em biotecnologia, localizada no Rio de Janeiro.

Foi realizado o sequenciamento da região V3-V4, com amplificação de fragmento de 466 bp utilizando os oligonucleotídeos 341F [CCTAYGGGRBGCASCAG] e 806R [GGACTACNNGGTATCTAAT]. Obtendo ao final as bibliotecas metagenômica do solo para análises com auxílio de ferramentas da bioinformática.

As bibliotecas de DNA foram geradas com NEBNext® Ultra TM Biblioteca de DNA Prep Kit para Illumina e quantificadas via Qubit.

As leituras do emparelhamento foram atribuídas as amostras com base em seu código de barras exclusivo. Estas sequências foram mescladas, usando uma ferramenta de análise muito rápida e precisa, o FLASH (2010). Com similaridade de 97%, as sequências de DNA foram agrupadas às mesmas em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs). A análise das sequências de DNA foi gerada no *Blast* (ALTSCHUL *et al.*, 1990) com QIIME (2010), que plota os resultados da bioinformática em imagens, para anotação da classificação em cada nível taxonômico. A informação da abundância das OTUs foi normalizada usando um padrão de número de sequência correspondente à amostra com as menores sequências. Com base nesses dados normalizados, obtidos pós filtragem, foram geradas a diversidade alfa e beta para a comunidade bacteriana.

A diversidade alfa foi aplicada na análise da complexidade da diversidade de espécies para uma amostra de três índices de diversidade, sendo espécies observadas, Shannon e Simpson. Todos esses índices de diversidade foram calculados via o QIIME (2010) (Versão 1.7.0).

Para a diversidade de beta foi determinada pelo QIIME (2010) para a matriz unifrac ponderado e não ponderado. Análise de coordenadas principais (PCoA) foi realizada para obter coordenadas principais e visualizar dados complexos e multidimensionais. A análise de PCoA foi exibida pelo pacote stat no software R (Versão 2.15.3). Para o método simples de agrupamento hierárquico aritmético (Unweighted Pair Group method using arithmetic averages - UPGMA) foi realizado como um tipo de método de agrupamento hierárquico para interpretar a matriz de distância, do PCoA, usando a ligação média e foi conduzido pelo software QIIME (Versão 1.7.0).

A análise de *Linear discriminant analysis effect size* foi conduzida pelo software LEfSe (SEGATA *et al.*, 2011). O valor de P foi calculado pelo método de teste de permutação, enquanto o valor de q foi calculado pelo método da False Discovery Rate de Benjamin e Hochberg (2009). Anosim, MRPP e Adonis

foram realizados pelo software R (pacote Vegan: função anosim, função mrpp e função adonis).

O teste estatístico das diferenças taxonômicas foi calculado pelo software Statistical Analysis of Metagenomic Profiles (STAMP) versão 2.0.0 (PARKS e BEIKO, 2010), com múltipla correção de Bonferroni ($P < 0,05$) (cobertura nominal de 95%).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Coleta das amostras e análises dos parâmetros físico-químicos

Neste estudo, foram apresentadas informações sobre a comunidade bacteriana presentes em amostras de solos do bioma Pantanal por meio da técnica metagenômica seguido por sequenciamento de DNA.

O resultado referente à avaliação da umidade entre amostras de solo, está apresentado na Tabela 2. A média do percentual da umidade do solo pantaneiro na área inundada foi de 21,79%, sendo que na área de reserva foi de 18,93%.

Tabela 2: Valores em porcentagem de umidade das amostras do solo, nos pontos da coleta de áreas de inundação e reserva, no Pantanal Sul-mato-grossense.

Amostras de solo	Umidade (%)
*SI.1	22,56
*SI.2	21,8
*SI.3	21,02
**SR.1	18,8
**SR.2	19,45
**SR.3	18,56

*SI.(): Solo Inundado seguido do número da amostra; **SR.(): Solo Reserva seguido do número da amostra.

Perante as medidas do percentual da umidade do solo pantaneiro na área inundada a média foi de 21,79%, sendo que na área reserva a média apresentada foi de 18,93%, destacando a presença de umidade mais elevada na área inundada quando comparada a área nativa. Essa diferença de umidade no solo é apresentada no estudo de Ma e colaboradores (2018), o qual a variante de água, umidade no solo, pode causar interferência direta aos micro-organismos no ambiente, além de promover a troca dos elementos nutritivos do solo.

As diferenças e semelhanças foram obtidas por meio da análise das propriedades físico-químicas das amostras de solo como dispostas na Tabela 3.

Análise físico-química dos solos do Pantanal, estão dispostos na Tabela 3. O diagnóstico das propriedades físico-químicas das amostras de solo nas diferentes áreas, inundada e reserva, demonstraram que o pH do solo aferido foi ácido, a área inundada com caráter mais ácido, pH 5.0, que a área de reserva, 6.1 (Tabela 3). Já em relação à distribuição das partículas de solo, ambas as áreas demostram parâmetros similares quanto a argila, areia e silte, sobressaindo a quantidade de areia na composição do solo.

Aos parâmetros de micronutrientes apresentaram variações pertinentes entre as áreas de estudo, inundada e reserva. Embora os valores para o cobre (Cu) e ferro (Fe) tenham sido observados com uma diferença significativa maior na área de inundação. Em contraponto, para magnésio (Mg) e cálcio (Ca) foram mais destacados na área da reserva.

Os parâmetros físico-químicos, como pH e fósforo (P), apresentados corroboram com o Cardoso e colaboradores (2018), sendo o diagnóstico das propriedades físico-químicas das amostras de solo nas diferentes áreas, inundada e reserva, demonstraram que o pH do solo aferido foi ácido. Os fatores abióticos, como o pH, são de extrema importância para a sobrevivência dos micro-organismos, principalmente com as comunidades bactérias (SEXSTONE *et al.*, 1985) (PHILIPPOT *et al.*, 2013).

O pH é a propriedade físico-químico de maior relevância quando se avalia a comunidade bacteriana, entretanto existem outras características, tais como a porcentagem de umidade do solo, concentração de matéria orgânica e até mesmo a quantidade de ferro e fósforo, presentes no solo que também são seletores de comunidades bacterianas (ESPENBERG 2018) (REN, 2018).

Tabela 3: Propriedades físico-químicas das amostras de solo de áreas de inundação e reserva coletadas no Pantanal Sul-mato-grossense.

Propriedades		Área	
físico-químicas		Solo Inundado	Solo Reserva
Argila	-----	110	107
Areia	(%)	854	851
Silte	----	36	42
pH	(CaCl ₂)	5,0	6,1
P	mg/dm ³	7,0	16
B	mg/dm ³	0,16	0,12
Cu	mg/dm ³	1,38	0,37
Fe	(mg/dm ³)	541,5	19,84
Z	(mg/dm ³)	0,52	1,31
Mn	(mg/dm ³)	102,2	163,1
Matéria Orgânica	(g/dm ³)	26,3	21,2
Ca	(mmol/dm ³)	17	34
Mg	(mmolc/dm ³)	3,0	8,0
K	(mmol/dm ³)	1,7	1,3
Al	(mmolc/dm ³)	1,0	1,0
Al + H	(mmolc/dm ³)	20	10

O Ministério do Meio Ambiente (2007) já demonstrava relação à distribuição das partículas de solo, o Pantanal dispõe da característica de solo arenoso, em ambas as amostragens, e baixo teor de fertilidade, sendo que apenas 4% da região possa ter alta fertilidade, também como proposto por Pereira e seus colaboradores no estudo em 2012. Também estão de acordo com a maior concentração do fosfato (P) na área de reserva, onde se encontra a floresta semidecídua no estudo de Cardoso, o qual tem maior disponibilidade assim como o sódio (Na). O pH é considerado por Lauber e seus cooperadores (2008) o melhor parâmetro físico-químico que se encaixa para identificação taxonômica das bactérias. Contudo Ma e colaboradores (2018) estabeleceu uma correlação entre o pH do solo e a umidade, sendo que o primeiro, pH, consegue determinar, previamente, um perfil dos micro-organismos (TRIPATHI *et al.*, 2016); e o segundo, umidade, é um fator limitante para os micro-organismos. Dessa maneira, estes dois parâmetros estão em uma mesma sintonia, a qual o solo com maior umidade tem como característica uma acides mais elevada, como demonstrado para os solos do Pantanal e os estudos também com solos úmidos em outros biomas do mundo.

Extração de DNA metagenômico

O resultado da extração direta de DNA foi avaliado via gel de agarose 0,8%. Como esperado, foi possível observar a presença de DNA metagenômico extraído com sucesso para todas as amostras de solo, como visualizado na Figura 5. As concentrações do DNA para os locais de coleta estão dispostas na Tabela 4.

As amostras extraídas de DNA tiveram pequena variação entre 14 a 20 ng/ μ L, demonstrando a eficiência na obtenção do DNA, sendo necessário 10ng/ μ L para a realização do sequenciamento de DNA deste.

Para a avaliação da integridade do DNA foi realizado a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), amplificando o gene 16S rDNA (Figura 6). Após confirmação da amplificação do gene 16S rDNA fica relatado a disponibilidade do DNA para com o sequenciamento de DNA em larga escala via plataforma Hiseq.

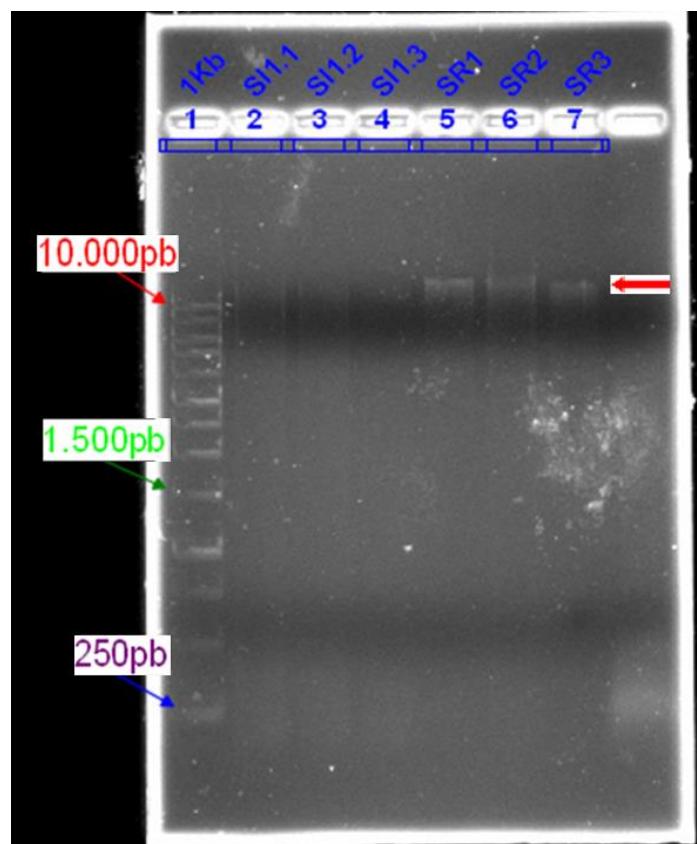


Figura 5: Gel de agarose 0,8% de extração do DNA das amostras solos, área inundada e área reserva, do Pantanal. Disposto do marcador molecular 1Kb plus seguido SI1.1: Solo Inundado ponto 1; SI1.2: Solo Inundado ponto 2; SI1.3: Solo Inundado ponto 3; SR1: Solo de Reserva ponto 1; SR2: Solo de Reserva ponto 2; SR3: Solo de Reserva ponto 3.

Tabela 4: Quantificação das amostras de DNA extraídas de solos do Pantanal Sul-mato-grossense. Amostras de solo Inundado e de Reserva.

Amostras	Concentração (ng/ µL)
SI.1 (solo inundado 1)	20
SI.2 (solo inundado 2)	14
SI.3 (solo inundado 3)	15,4
SR.1 (solo reserva 1)	22
SR.2 (solo reserva 2)	14,3
SR.3 (solo reserva 2)	15,6

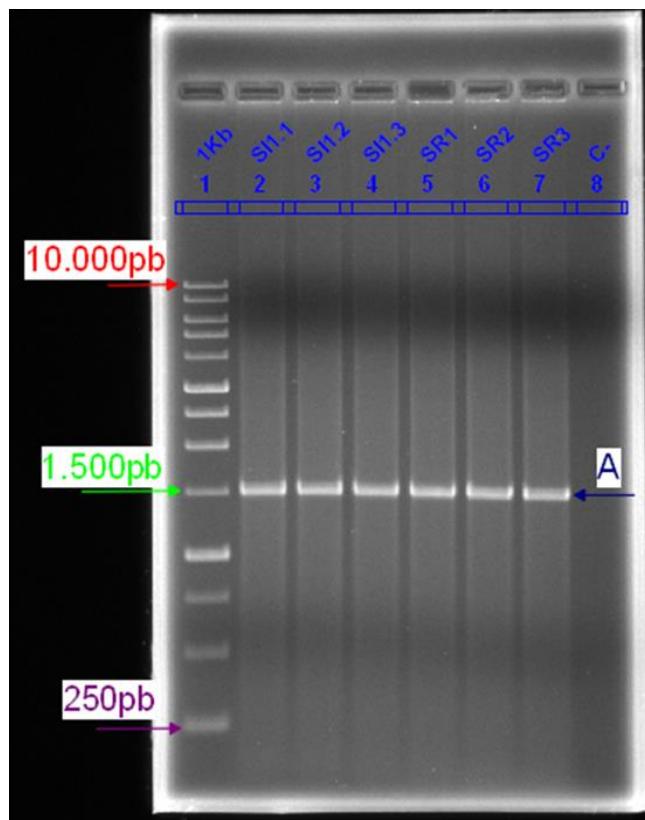


Figura 6: Gel de agarose 0,8% das amplificações, gene 16S rDNA, da extração do DNA das amostras solos, área inundada e área reserva, do Pantanal. A: Tamanho de fragmento esperado (1450pb) do gene 16S rDNA.

Como ressaltado por Santos e seus colaboradores (2002), no trabalho isolamento e amplificação de DNA de amostras de solo como ferramenta para avaliar a diversidade das populações de bactérias em solos Agrícolas. da Embrapa agrobiologia, que a amplificação via PCR de *primers* de micro-organismos, por mais brandos que sejam esses no ambiente, é possível a detecção destes. Demonstrando tanto a concentração de DNA metagenômico (Tabela 4) quanto a presença de bandas no gel de agarose (Figura 6) a viabilidade do DNA metagenômico para o envio para a realização do sequenciamento de DNA. Para tal realização, a empresa GenOne solicita o envio de aproximadamente 10ng/ μ L do DNA metagenômico para cada amostra.

Análise da comunidade microbiana do solo

Um total de 592.401 leituras brutas (154.087.046pb) foram geradas a partir das três réplicas metagenômicas de solo provenientes da região inundada (SI) (Tabela 5), sendo 215.828 (82.676.634 pb) e 376.573 (71.410.412 pb)

representativas do gene 16S rDNA, região V3-V4, com comprimento médio de 416 pb.

Para as amostras do solo da região de reserva (SR), foram geradas 409.189 leituras brutas (121.740.020 pb) (Tabela 5), constituindo 217.139 (82.716.382 pb) para a região genica V3-V4, com 418pb de comprimento médio. Um total de 25.566 (4,3%) leituras não foram combinadas para as amostras da área inundada, as quais foram geradas durante o corte QC (Quality Control) antes mesmo do procedimento de anotação metagenômica. E 35.788 (8,7%) leituras de baixa qualidade foram removidas das amostras de solos da reserva.

Tabela 5: Analise das sequências brutas processadas e filtragem de Quality Control (QC) a partir da análise de sequenciamento de metagenoma para área inundada, e área reserva, de ambos os primers sequenciados.

Amostras	Total leituras	leituras combinadas	leituras não combinadas	Percentual combinado (%)	Base (bp) combinadas
SI.1	181.161	173.822	7.339	95.11	47808.029
SI.2	203.041	192.634	10.407	94.43	53565.279
SI.3	208.199	200.379	7.82	95.25	52713.738
Total	592.401	566.835	25.566	94.93	154087.046
SR.1	125.94	112.834	13.106	89.27	38221.729
SR.2	155.389	144.971	10.418	93.26	45807.509
SR.3	127.86	115.596	12.264	90.37	37710.782
Total	409.189	373.401	35.788	90.96	121740.02

A partir destes resultados presente no estudo, foi possível detectar diferenças significativas referentes à abundância relativa de filos e classes das regiões bacterianas (V3-V4) quando considerando ($\alpha 0.05$) ($p\text{-value} < 0,01$) para as amostras de solo do Pantanal (Figura 7). Para os filos bacterianos destacam-se os Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Acidobacteria, Chloroflexi, Gemmatimonadetes, Verrucomicrobia, Tectomicrobia e Thaumarchaeota (Figura 8).

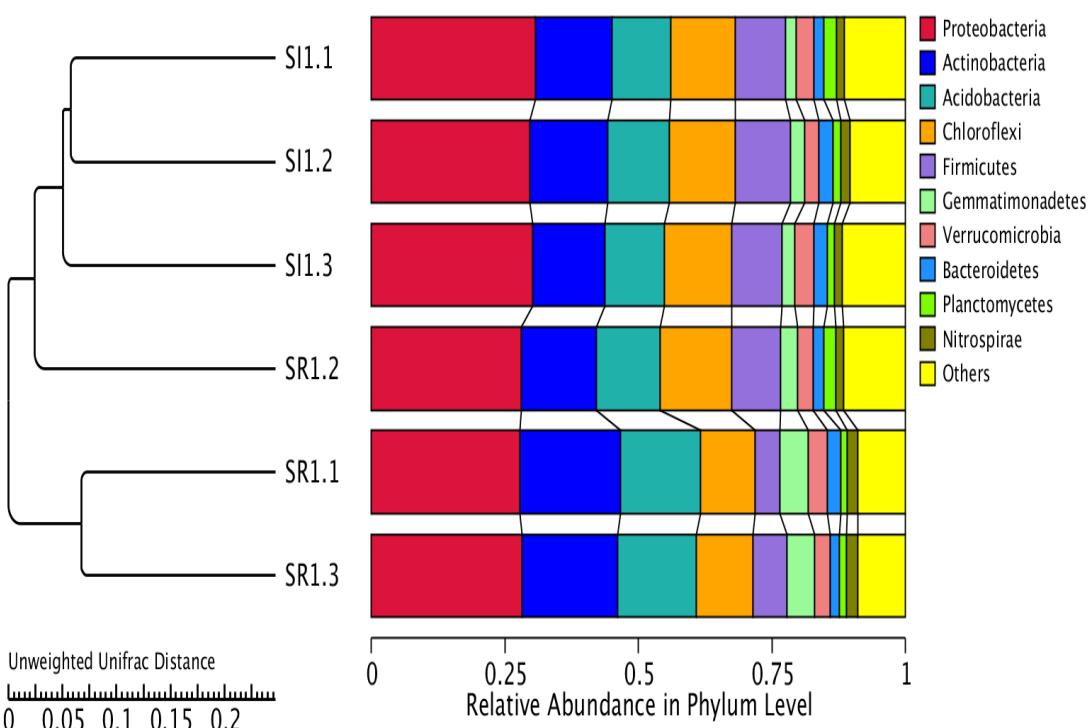


Figura 7 : Dendograma da análise de agrupamento com base na distância euclidiana para a comunidade de bactérias, região V3-V4, para amostras de solo do Pantanal, áreas inundadas (SI) e reserva (SR).

O estudo teve a análise da diversidade microbiana a qual revelou a existência de comunidades diversas, mas amplamente consistentes. Proteobactérias, Actinobactérias e Firmicutes predominaram na pesquisa de sequenciamento de DNA, destacado pela presença em regiões de lagos tropical (PAUL *et al.*, 2016).

Para o Dendrograma da comunidade bacteriana pode-se destacar três filos como os mais abundantes, são estes, Proteobacteria, Actinobacteria e Acidobacteria; os quais também são reconhecidos em outros estudos nos solos do Brasil (PAJARES *et al.*, 2018) (DE ARAUJO *et al.*, 2017) (DE CASTRO *et al.*,

2016) (CATÃO *et al.*, 2014 a), principalmente no bioma Cerrado (VIERA *et al.*, 2018), o qual é grande destaque, quanto abundância, no bioma Pantanal.

O filo Proteobacteria é comumente encontrado em destaque para com outros estudos referentes a zonas úmidas e/ou alagadas (LI *et al.*, 2018) (ZANG *et al.*, 2017) (ZANG *et al.*, 2018 a). Além de corroborar com de Castro e colaboradores (2016), quanto a presença de umidade que promove um aumento na abundância de Proteobactérias e também destaca a associação de aquisição de ferro, frente a seca, abrindo a possibilidade de influência no elevado teor de ferro encontrado nas amostras de solo em área alagada, enquanto há baixo teor na área seca. Zhang e seus colaboradores (2018 b) explicam que estes micro-organismos no solo são mais suscetíveis ao meio ambiente, essas diferenças se devam aos ambientes naturais das regiões (CHUNG *et al.*, 2018) (ZHANG *et al.*, 2017).

De acordo com Carvalho e seus colaboradores (2018) os solos de Savana brasileira com maior cobertura vegetal, diversidade de plantas, tende a obter maior biomassa de micro-organismos, confirmando os resultados obtidos neste estudo, para bactérias, o qual há uma abundância considerável para a região da área reserva.

Para os gêneros mais abundantes em cada área foi montado o gráfico de barras, para melhor visualização da distribuição dos dez gêneros com maior relevância. Os gêneros bacterianos estão dispostos na figura 8, a qual é possível observar os gêneros *Pseudarthrobacter*, *Bacillus*, *Acidothermus*, *Bradyrhizobium* e *Rhodomicrobium* com maior abundância relativa na área inundada, destacando os dois primeiros como gêneros mais encontrados no solo pantaneiro, os demais gêneros, como *RB41*, *Candidatus_Solibacter*, *Pseudolabrys*, *H16*, *Gaiella* e classificados como outros, apresentam maior abundância para a área de reserva. Além de, mais de 50% dos gêneros em ambas as áreas que estão identificados com outros, por não apresentarem uma abundância relativa significativa dentre os 10 mais gêneros encontrados nas áreas de estudo.

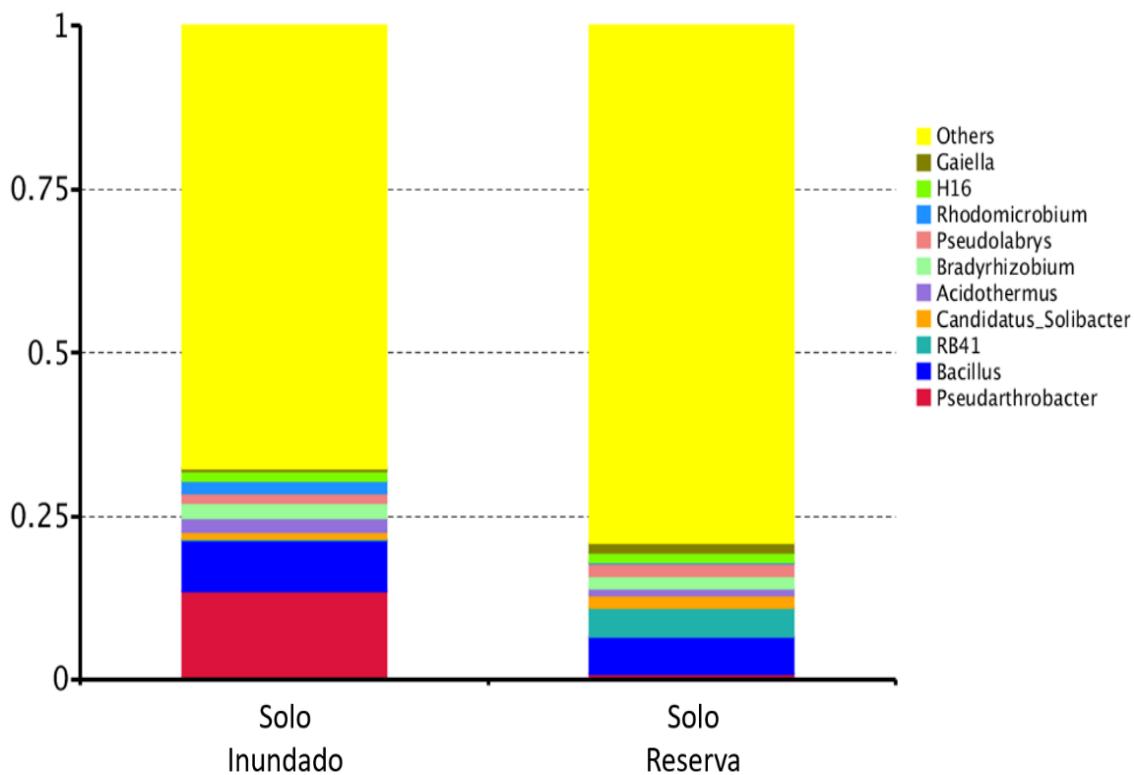


Figura 8: Gráfico dos 10 gêneros bacterianos com maior abundância relativa nas áreas inundada e reserva de coletas na região Nhecolândia no Pantanal Sul-mato-grossense.

Nos estudos do Zhang e colaboradores (2018 a) com áreas húmidas os gêneros *Pseudarthrobacter*, *Bacillus*, *Acidothermus*, *Bradyrhizobium*, *Rhodomicrobium*, *Candidatus_Solibacter*, *Pseudolabrys* e *Gaiella* também foram observados, corroborando com este estudo. *Pseudarthrobacter* se destacou por ser o gênero dominante no fator de radiação solar, sendo que neste estudo a área inundada se encontra em campo aberto, obtendo radiação direta prevalecendo o gênero nesta área, diferentemente da área reserva que há prevalência de vegetais arbóreas que diminuem a incidência de radiação solar. O gênero *Acidothermus* se destacou como dominante na região com maior prevalência de água. Estes gêneros, destacados neste estudo, podem ser micro-organismos chaves de trabalhos futuros com o solo do Pantanal, afim de delinear melhor as metodologias tanto de caracterização quanto de recuperação das áreas.

Adicionalmente, Wang e colaboradores (2018 a) relata que os gêneros *Pseudarthrobacter* e *Bacillus* são encontrados em diferentes níveis de solos e também como principal relação foram por serem os mais abundantes na presença de Fe, sendo altamente eficazes na solubilização. Além disso de acordo com Zheng e colaboradora (2019), demonstram a abundância de *Bacillus* em relação às comunidades bacterianas importantes na mobilização de fosforo

(P) no solo. Padro e colaboradores (2011) destacam o gênero *Bacillus* nos solos do cerrado brasileiro, corroborando com o observado em nossos estudos, ele justifica a presença desse gênero principalmente pela característica ácida do solo, a qual também oscila a mesma faixa de pH encontrada no solo pantaneiro.

Alfa e Beta diversidade da microbiota do solo

Análise taxonômica demonstra a presença de 39 filos bacterianos. Os 10 filos mais abundantes em ambas as áreas são Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Acidobacteria, Chloroflexi, Gemmatimonadetes, Verrucomicrobia, Nitrospirae, Tectomicrobia, Thaumarchaeota e os demais filos, na sequência de maior representatividade. Quatro desses filos são mais abundantes na área inundada como Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes e Chloroflexi, os demais são destacados na área reserva. Contudo, foram encontrados três filos exclusivos para solo inundado (SI), identificados como Berkelbacteria, Absconditabacteria e Cloacimonetes; e dois filos para o solo reserva (SR), identificados como WS2 e WS6.

O diagrama de Venn disposto na figura 9 demonstrou 3.900 OTUs para a área reserva e 3.705 OTUs para a área inundada, e 2.809 OTUs semelhantes que são compartilhadas nas áreas. Juntamente com o gráfico da figura 10 que compara o número de sequencias com o número de OTUS produzidas em ambas as áreas, e que também apresentam disposições semelhantes. Relacionando que as amostras de solo produziram uma quantidade semelhante de OTUs por sequencias, e as áreas obtiveram um expressivo compartilhamento de OTUs. Dentre alguns dos filos que são compartilhados pelas áreas estão as Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chlamydiae, Chlorobi, Chloroflexi, Cyanobacteria, Deinococcus, Elusimicrobia, Fibrobacteres, Firmicutes, Gemmatimonadetes, Hydrogenedentes, Ignavibacteriae, Latescibacteria, Nitrospirae, Planctomycetes, Proteobacteria, Saccharibacteria, Spirochaetes, Tectomicrobia, Thermomicrobia e Verrucomicrobia.

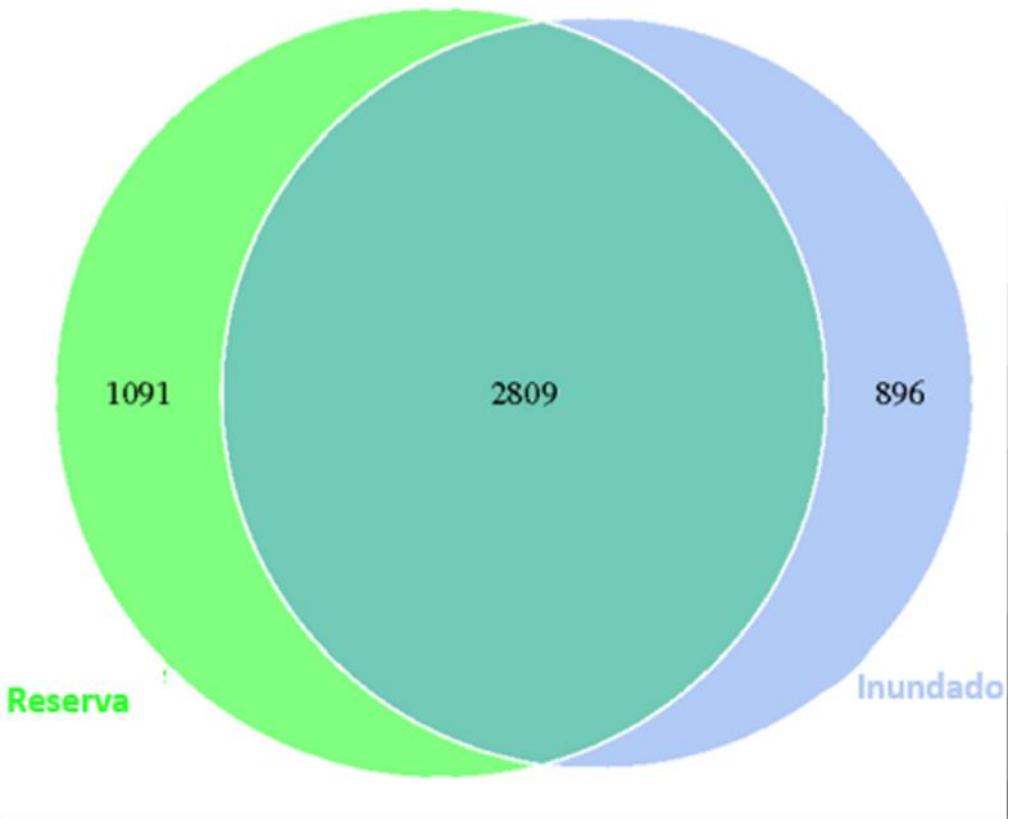


Figura 9: Diagrama de Venn para as áreas inundada e reserva do Pantanal Sul-mato-grossense.

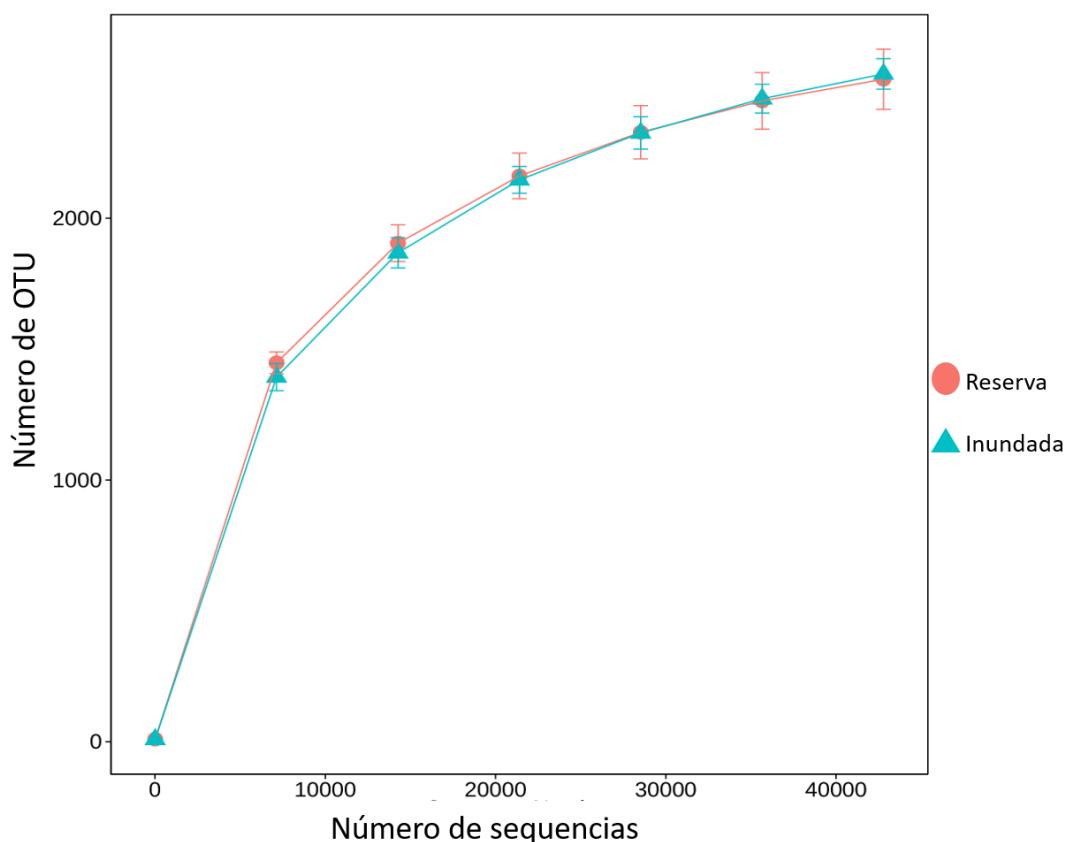


Figura 10: A curva de rarefação com os números de OTUs bacterianas observadas por número de sequencias amostradas entre as áreas Inundadas (linha azul), e Reserva (linha vermelho).

Com base nos resultados demonstrados na Tabela 6 de diversidade alfa das comunidades bacterianas, nas amostras de solo reserva (SR) apresentaram maiores valores referentes aos valores de Shannon. O índice de cálculo de diversidade possuiu média de 9.268 para Shannon para a área reserva (SR), e 8.476 para a área inundada (SI). Com o destaque para a amostra SR1 (solo de reserva ponto 1) mais diversa perante Shannon. Os valores dos índices de diversidade referentes ao Simpson foram próximos nas áreas estudadas sendo a média de 0.994 para a área reserva e para a área inundada foi de e 0.993, com destaque para as amostras SR1 e SR3 (solo de reserva pontos 1 e 3) em conjunto para Simpson. Assim como para o número de espécies observadas em ambas as áreas de estudo; inundado que teve média de 2.551, em contraponto média de espécies observadas há área reserva de 2.531.

Tabela 6: Número estatísticos das sequências bacterianas de Shannon e Simpson, para amostras de solo do Pantanal, área inundada e reserva.

Amostras	Spp_Obs	Shannon	Simpson
*SI.1	2625	9.096	0,993
*SI.2	2546	8.126	0,961
*SI.3	2482	8.205	0,960
Média	2551	8,476	0,993
**SR.1	2437	9.381	0,996
**SR.2	2693	9.060	0,989
**SR.3	2463	9.362	0,996
Média	2531	9,268	0,994

*SI.(__): Solo Inundado seguido do número da amostra; **SR.(__): Solo Reserva seguido do número da amostra.

A análise de beta diversidade gerada no gráfico PCoA (Figura 11), foi determinada por meio da distância não ponderada, Unweight UniFrac. Por meio desta análise foi possível observar para a área inundada obteve uma similaridade na análise, esta pode ser interpretada como a menor variabilidade de bactérias. Diferente para a área de reserva a qual apresentou maior riqueza de micro-organismos, possibilitando uma diferenciação maior entre as amostras sequenciadas. Juntamente, a análise do dendograma corroborou com o gráfico de PCoA (Figura 11), o dendrograma filogenético das bactérias podemos destacar 3 filos: Proteobacteria, Actinobacteria e Acidobacteria; além de apresentar a amostra SR.2 que obteve menor similaridade com as amostras do próprio grupo, reserva.

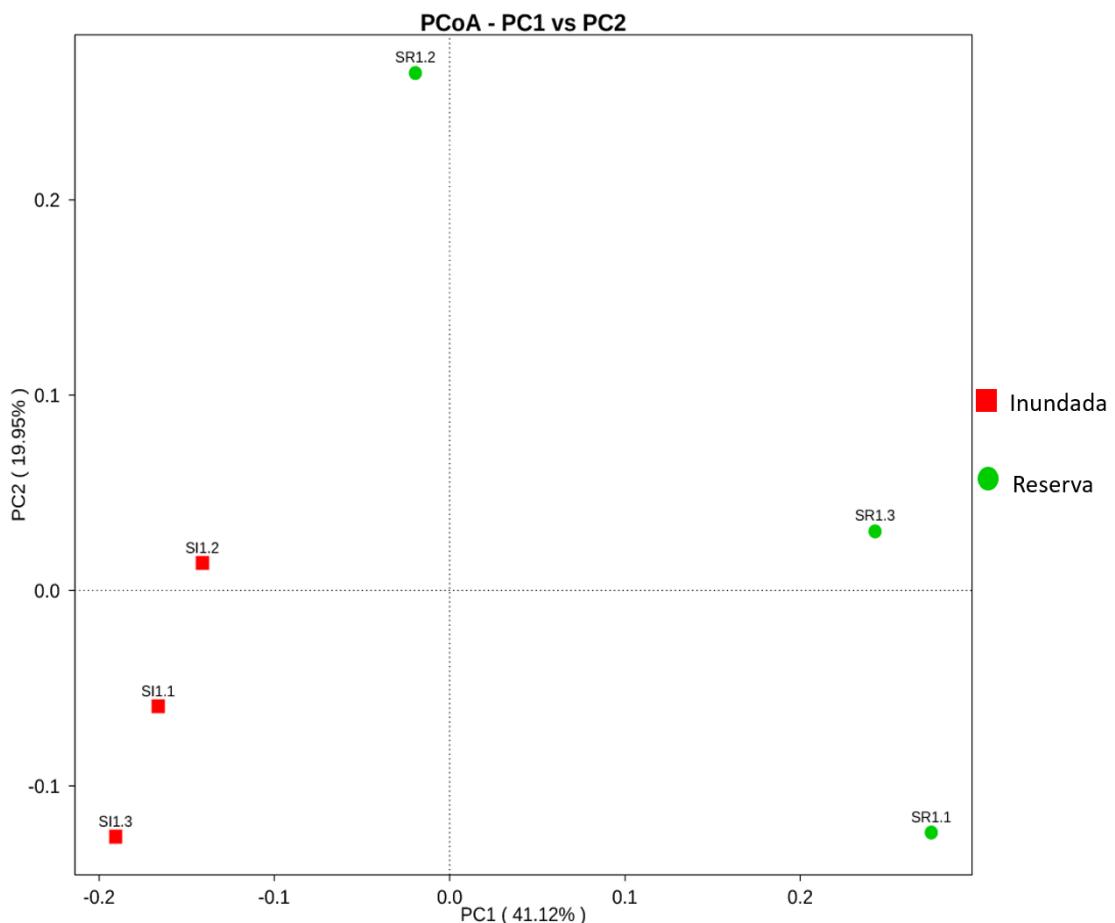


Figura 11: Análise de Coordenadas Principais (PCoA) das amostras bacterianas de solos do Pantanal. Essa análise foi baseada no agrupamento das matrizes de similaridade Unweight UniFrac não ponderada.

No estudo de Segata e seus colaboradores (2011), o LEfSe (*Linear discriminant analysis effect size*) pode ser aplicado a vários dados, inclusive aos dados ambientais. Possibilitando afirmar com maior convicção os biomarcadores

e que em conjunto com o Stamp apresentaram similaridade frente aos táxons bacterianos, com a classe Clostridia para área inundada, e classe Thermoleophilia para reserva, isso pode ser devido ao Stamp poder comparar pares únicos de metagenomas como dito por Parques e Beiko (2010) corroborando com as mais análises do LEfSe.

No presente estudo foi possível a identificação, através da Análise Discriminante Linear (LDA), das bactérias como prováveis biomarcadores em ambas as áreas de estudo analisadas. Perante o exposto na figura 12 foi possível observar os possíveis biomarcadores para a área inundada, como: a classes Clostridia e “desconhecidas” de Actinobacteria, Ordens Micrococcales e Clostridiales; Família Micrococcaceae; e Gênero *Pseudarthrobacter*. E para a área reserva foram encontrados os táxons como possíveis biomarcadores os: Filos Acidobacteria e Gemmatimonadetes; Classes Thermoleophilia e desconhecidas de Gemmatimonadetes; Ordens Solirubrobacterales e Gemmatimonadales, e Família Gemmatimonadaceae (Figura 12).

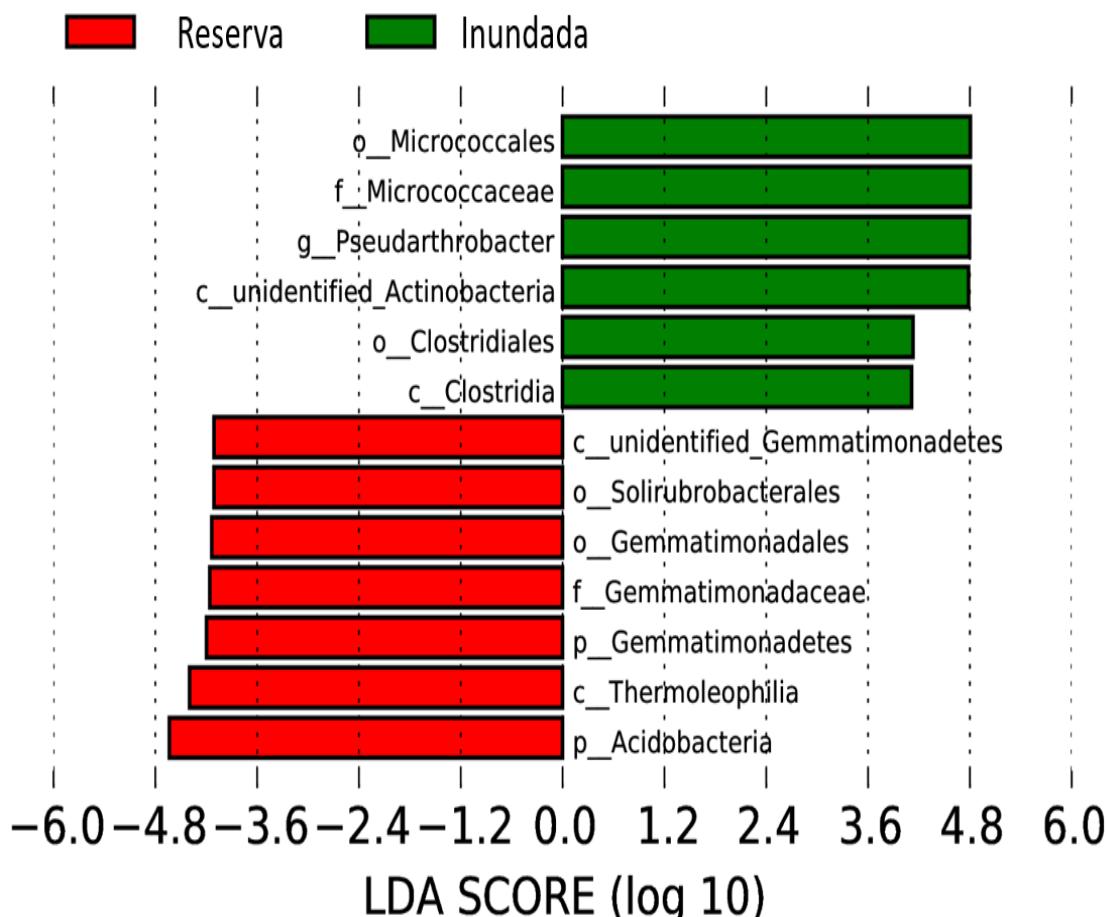


Figura 12: Gráfico LDA, Biomarcadores bacterianos de solo do Pantanal.

A promoção da identificação de biomarcadores tem confirmado, cada vez mais, ser um dos meios mais promissores, sendo bem-sucedidos e amplamente aplicáveis, de traduzir dados moleculares e genômicos, diz Segata e seus colaboradores (2011). Para Wang e seus colaboradores (2018 b) solos húmidos e a baixa concentração de P está ligado diretamente com a classe Clostridia, além de apresentar correlação negativa com o filo Acidobacteria, corroborando com nosso estudo, onde a maior concentração de P (fosforo) na área reserva, conforme exposto na figura 12.

De acordo com a Figura 13 são demonstrados quatro filos bacterianos com a relevância significativa para a área inundada, o qual houve um aumento dos filos na área inundada quando comparado com a área de reserva, como Euryarchaeota, Ignavibacteriae, Spirochaetes e Fibrobacteres; por outro lado houve uma diminuição de dois filos frente a área inundada quando comparado com a reserva, como Acidobacteria e Thermomicrobia. Destacando a maior disparidade, frente a abundância, que obteve um aumento mais significativo na área reserva, no filo Acidobacteria.

O filo Euryarchaeota é destacado como um dos 10 filos mais dominantes em amostras de solos das áreas húmidas e alagadas estudadas por Zhang e seus colaboradores (2018 a), corroborando com o estudo, onde há um aumento significativo, determinado pelo STAMP, do filo na área inundada. Além disso a classe Methanomicrobia, a qual também há destaque no STAMP para o aumento na área inundada, é pertencente ao filo Euryarchaeota.

O filo Acidobacteria teve uma diminuição na área inundada e o aumento na reserva, indo de acordo com Castro e colaboradores (2016), com relação a solos do Cerrado frente à chuva e seca, o qual também demonstra o aumento do filo no período de seca em campo sujo. De acordo com Catão e colaboradores (2014 b) o filo Acidobacteria é de extrema importância para entender melhor os papéis ecológicos dos micro-organismos no solo. Assim como corrobora com o Araújo e seus colaboradores (2012) que este é o um dos filos mais dominantes em solos de Savana (Cerrado), sendo o Pantanal uma região de Savana alagada (NUNES DA CUNHA *et al.*, 2015).

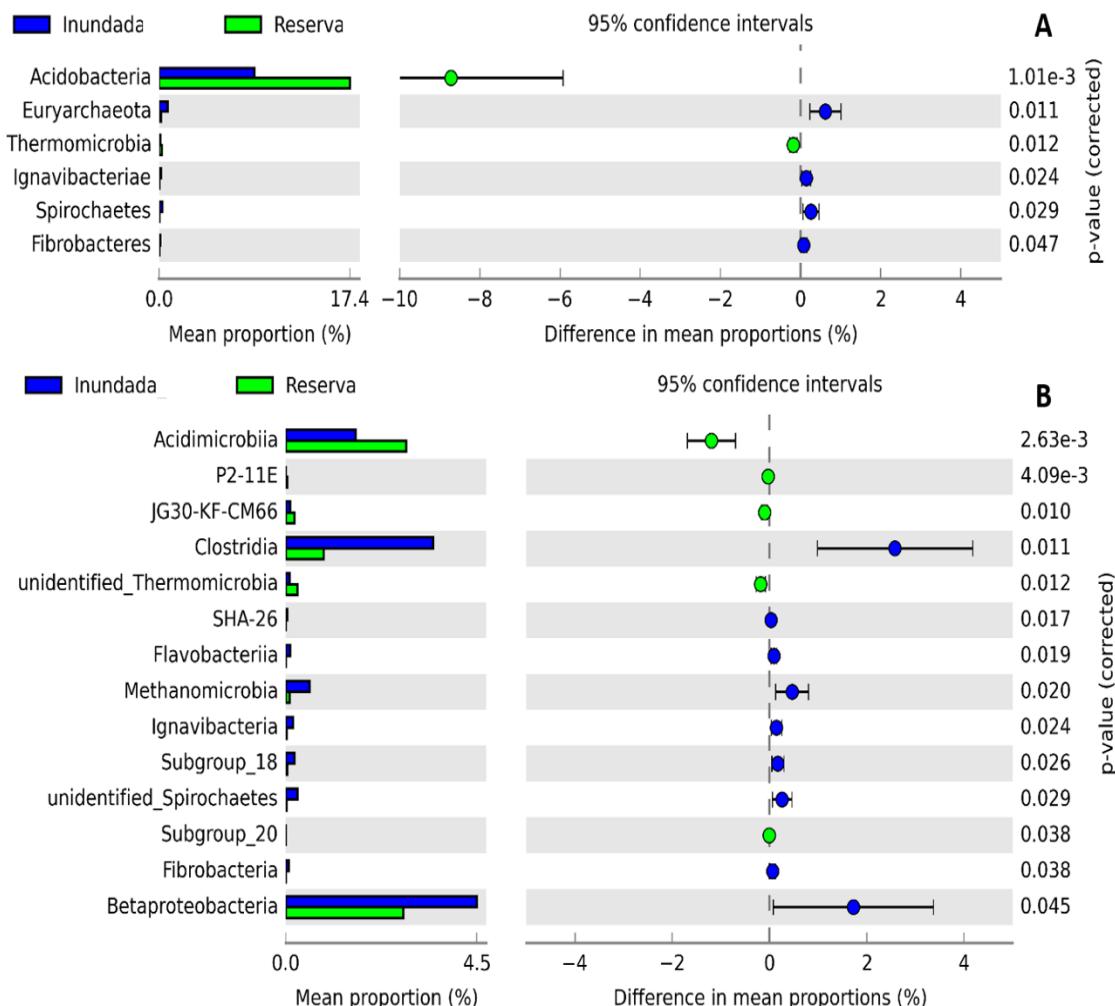


Figura 13: Proporção de abundância relativa referente a comunidade bacteriana (V3-V4) entre a área inundada, em azul, e reserva, em verde, sendo A para Filo e B para Classe. O gráfico demonstra primeiramente a proporção média de filos e classes bacterianas, a diferença nas proporções médias para cada grupo analisado e por último o *p*-value indicando se a proporção média é igual para uma determinada amostra.

Esta significativa diferença de Acidobactérias encontrada entre as duas áreas de coleta está correlacionada ao pH, que apresentou maior riqueza em solo nativo, sendo que este com o pH menos ácido ao solo inundado, está de acordo com Catão e seus colaboradores (2014 a) que verificou a correlação negativa entre abundância de Acidobactérias e o pH de solos entre biomas, como o Cerrado. Para o perfil de classes que mostraram maior estrutura no solo inundado com nove classes mais significativas, em comparação às quatro classes no solo de reserva, assim como proposto no Zhang e seus colaboradores (2017), que as taxas bacterianas são significativamente mais diferentes em zonas húmidas, abrangendo também a classe de Betaproteobacteria, que é prevalente em sedimentos fluviais.

A Classe Clostridia, que apresenta um aumento da proporção quando a área é inundada, pertencente ao filo Firmicutes, o qual no trabalho de Castro e colaboradores (2016) também apresenta um aumento do filo no cerrado sujo. Como o Pantanal é considerado um Cerrado alagado, por Junk (2013), e no estudo realizado nesse trabalho, diversos táxons apresentam semelhança de perfil ao bioma Cerrado, inclusive o comportamento na presença de água, visto no trabalho de Castro e seus colaboradores (2016), a integração dos estudos corroboram as análises de interpretações das sequências do DNA metagenômico de solo pantaneiro. Para Wang e colaboradores (2018 b) os táxons Clostridia e Betaproteobacteria são destacados como táxons de áreas inundadas, entretanto ambos apresentam comportamento diferenciado quando dispostos a concentrações de água e fósforo no ambiente, contrapondo o observado no gráfico gerado pelo STAMP.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVA

Neste estudo, baseado na extração direta do DNA de amostras de solos e sequenciamento do gene 16S rDNA, sub-região V3-V4, foi possível identificar taxonomicamente as comunidades bacterianas presente nas amostras das áreas inundada e reserva do Pantanal Sul-mato-grossense. Como base dada na análise de sequenciamento de DNA, pode-se perceber que a disponibilidade da presença de água pode ser considerada um fator abiótico, que influencia na composição da comunidade bacteriana.

Desse modo, houve significativas alterações em relação ao perfil taxonômico das bactérias presentes nos solos da região de Nhecolândia, localizada na parte alagada do Pantanal. Demonstrada pelo gráfico PCoA a proximidade dos pontos da área inundada em comparação a reserva, a qual, esta última, exibe uma maior riqueza bactéria dada a distância das coordenadas.

A semelhança do bioma Pantanal com o Cerrado, tanto nas fitofisionomias de flora quanto fauna, também apresenta comportamentos do perfil da biomassa bacteriana e seu comportamento com a presença de água, ao cerrado campo sujo, quando observados o comportamento dos filos Proteobacteria, Actinobacteria e Acidobacteria, que são os mais abundantes em ambos os biomas. Além do mais, a área inundada demonstrar um perfil, com os táxons de gêneros *Pseudarthrobacter*, *Bacillus*, *Acidothermus* e *Bradyrhizobium*, que são semelhantes a outros estudos com amostras com as mesmas características encontradas em outras regiões do mundo.

A promoção do estudo, do mesmo modo, ressalta a presença do biomarcador, como o gênero *Pseudarthrobacter* que está diretamente ligado à presença de água no solo. Mesmo que ainda haja mais fatores de interações promotores de mais estudos de ambas as áreas, já é um novo passo para as novas descobertas metagenômicas de solos.

A diversidade de táxons presentes no Pantanal e a dinâmica destes frente ao longo período de inundação tomam grande impulso, mas ainda há necessidade de novos estudos; principalmente em relação a funcionalidade desses microrganismos no ambiente de interesse, que possuem diversos genes funcionais à serem estudados. Como é o primeiro estudo desse porte, com a técnica de metagenômica, nos solos do Pantanal que pode detalhar os táxons, como os filos e gêneros presentes no bioma, esse pode potencializar e direcionar

os futuros estudos, sendo mais detalhados nas áreas de interesse, auxiliando em melhores estratégias de estudos na região. Acresentando mais ainda a promoção do Pantanal como um bioma a ser olhado com curiosidade e crescimento na pesquisa; demonstrando seus potenciais biotecnológicos nas diversas áreas de atuação, como na biorremediação ou busca de novos genes de interesse.

REFERÊNCIAS

- Acea M. J.; Moore C. R.; Alexander M. Survival and growth of bacteria introduced into soil. *Soil Biol. Biochem.* 20, 509–515 (1988).
- Ai F. A.; Butenschoen O. R. H. Elevated tropospheric CO₂ and O₃ concentrations impair organic pollutant removal from grassland soil. *Scientific Reports* volume 8, Article number: 4500 (2018).
- Alho, C. J. Concluding remarks: overall impacts on biodiversity and future perspectives for conservation in the Pantanal biome. *Braz J Biol.* 71(1 Suppl 1): p. 337-41. (2011).
- Alho, C. J. R.; Sabino, J. A conservation agenda for the Pantanal's biodiversity. *Braz. J. Biol.* vol.71 no.1 supl.1 São Carlos Apr. (2011).
- Altschul S F, Gish W, Miller W, et al. Basic local alignment search tool. [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1990, 215(3):403-10.
- Araújo A. F.; de Castro A. P.; Costa M. M. C.; Togawa R. C.; Pappas Júnior G J.; Quirino B. F.; Bustamante M. M. C.; Williamson L.; Handelsman J.; Krüger R. H.; Characterization of Soil Bacterial Assemblies in Brazilian Savanna-Like Vegetation Reveals Acidobacteria Dominance. *Microbial Ecology*, Volume 64, Issue 3, pp 760–770. October (2012).
- Baker K. L.; Langenheder S.; Nicol G. W.; Ricketts D.; Killham K.; Campbell C. D.; Prosser J. I. Environmental and spatial characterisation of bacterial community composition in soil to inform sampling strategies. *Soil Biol Biochem* 41: 2292–2298. (2009).
- Baldrian P.; Head I. M.; Prosser J. I.; Schloter M.; Smalla K.; Tebbe C. C.; Ecology and metagenomics of soil microorganisms, *FEMS Microbiology Ecology*, Volume 78. Pages 1–2 October (2011).
- Barbiero L.; Queiroz Neto J. P.; Ciornei G.; Sakamoto A.; Capellari B.; Fernandes, E., Valles V. Geochemistry of water and groundwater in the Nhecolândia, Pantanal of Mato Grosso, Brazil: variability and associated processes. *Wetlands*, v.22, n.3, 528-540p. (2002).
- Bashan Y.; de-Bashan L. E.; Prabhu S. R.; Hernandez J. P.; Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant Soil* 378, 1–33 (2014).
- Blagodatskaya E.; Kuzyakov Y. Active microorganisms in soil: critical review of estimation criteria and approaches. *Soil Biol. Biochem.* 67, 192–211 (2013).

Bokulich N. A.; *et al.* Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature methods* 10.1 (2013): 57-59.

Buchkowski R. W.; Bradford M. A.; Grandy A. S.; Schmitz O. J.; Wieder W. R. Applying population and community ecology theory to advance understanding of belowground biogeochemistry. doi: 10.1111/ele.12712. *Ecology Letters* 231-245. Feb;20(2) (2017).

Caporaso J.G., *et al.*, QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*. 7(5): p. 335-6. (2010).

Carvalho. N. S.; Rocha S. M. B.; Santos V. M.; Araújo F. F.; Araújo A. S. Soil Microbial Biomass Across a Gradient of Preserved Native Cerrado. *Floresta e Ambiente*, 25(2), e20170536. Epub June 11, (2018). <https://dx.doi.org/10.1590/2179-8087.053617>.

Cardoso E. L. Qualidade do solo em sistemas de pastagens cultivada e nativa na sub-região da Nhecolândia, Pantanal sul-mato-grossense. in Universidade Federal de Lavras. Lavras p. 153. (2008).

Catão E. C.; Lopes F. A.; Araújo J. F.; de Castro A. P.; Barreto C. C.; Bustamante M. M.; Quirino B. F.; Krüger R. H. Soil Acidobacterial 16S rRNA Gene Sequences Reveal Subgroup Level Differences between Savanna-Like Cerrado and Atlantic Forest Brazilian Biomes. *International journal of microbiology*. 156341. (2014) a.

Catão E.; Lopes F.; da Silva M.; Santana R.; Bustamante M.; Krüger R. Diversity and Function of Bacterial Assemblages in Savanna Vegetation Soils. In: Maheshwari D. (eds) *Bacterial Diversity in Sustainable Agriculture. Sustainable Development and Biodiversity*, vol 1. Springer, Cham (2014) b.

Chu H.; Fierer N.; Lauber C. L.; Caporaso J. G.; Knight R.; Grogan P. Soil bacterial diversity in the Arctic is not fundamentally different from that found in other biomes. *Environ Microbiol*, v. 12, n. 11, p. 2998–3006, (2010).

Chung, L. *et al.* *Bacteroides fragilis* Toxin Coordinates a Pro-carcinogenic Inflammatory Cascade via Targeting of Colonic Epithelial Cells. *Cell Host & Microbe* 23, 421 (2018).

Clarholm M. Protozoan grazing of bacteria in soil – impact and importance. *Microbial Ecol* 7: 343–350. (1981).

Clarke K.R. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology*. 18: p. 117-143. (1993).

Junk W. J. Classificação e delineamento das áreas úmidas brasileiras e de seus macrohabitats [recurso eletronico] / Catia Nunes da Cunha, Maria Teresa Fernandes Piedade. Cuiabá: EdUFMT, (2015).

de Araujo A. S. F.; Bezerra W. M.; Dos Santos V. M.; Rocha S. M. B.; Carvalho N. S.; Lyra M. C. C. P.; Figueiredo M. V. B.; Lopes A. C. A.; Melo V. M. M. Distinct bacterial communities across a gradient of vegetation from a preserved Brazilian Cerrado. *Antonie Van Leeuwenhoek*. Published online 2017 Jan 6. doi: 10.1007/s10482-016-0815-1 Jan 6 (2017).

de Castro A. P.; Fernandes G da R; Franco O. L. Insights into novel antimicrobial compounds and antibiotic resistance genes from soil metagenomes *Front Microbiol*. 5: 489. (2014).

de Castro A. P.; da Silva M. R. S.; Quirino B. F.; da Cunha B. M. M.; Krüger R. H. Microbial Diversity in Cerrado Biome (Neotropical Savanna) Soils. *PLoS One.* 2016; 11(2): e0148785. doi: 10.1371/journal.pone.0148785. Published Feb 5 (2016).

Dechesne A.; Owsianik M.; Bazire A.; Grundmann GL.; Binning P. J.; Smets B. F. Biodegradation in a partially saturated sand matrix: compounding effects of water content, bacterial spatial distribution, and motility. *Environ Sci Technol* 44: 2386–2392. (2010).

Edgar R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics.* p. 2460-2461. 26(19) (2010).

FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. T. Magoc and S. Salzberg. *Bioinformatics* 27:21 (2011).

Fierer N. Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews Microbiology* volume15, pages579–590 (2017)

Fierer N.; et al., Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(52): p. 21390-5. (2012).

Franklin R. B.; Mills A. L. Multi-scale variation in spatial heterogeneity for microbial community structure in an eastern Virginia agricultural field. *FEMS Microbiol Ecol* 44: 335–346. (2003).

Goedert W.J. Solos dos Cerrados. Ed. Nobel, São Paulo e EMBRAPA, CPAC, Brasília., (1985).

Guimaraes, J.R.; et al., Mercury net methylation in five tropical flood plain regions of Brazil: high in the root zone of floating macrophyte mats but low in surface sediments and flooded soils. *Sci Total Environ*, 2000. 261(1-3): p. 99-107.

Graham E. B.; Knelman J. E.; Schindlbacher A.; Siciliano S.; Breulmann M.; Yannarell A.; Nemergut D. R. Microbes as Engines of Ecosystem Function: When Does Community Structure Enhance Predictions of Ecosystem Processes? *Frontiers in Microbiology*, 7, 214. (2016). <http://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00214>

Griffiths R. I. et al. The bacterial biogeography of British soils. This study maps soil bacterial communities across Great Britain and demonstrates that the diversity and composition of these communities are predictable from soil pH. *Environ. Microbiol.* 13, 1642–1654. (2011).

Haas B. J.; et al. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome research* 21.3 (2011): 494-504.

Handelsman J., et al., Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol*, 5(10): p. R245-9. (1998).

Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68(4): p. 669-85. (2004).

Harris M. B., et al., Estimativas de perda da área natural da Bacia do Alto Paraguai e Pantanal Brasileiro.Relatório técnico. Conservação Internacional, Campo Grande, MS. (2005).

Hylander L. D. et al. Relationship of mercury with aluminum, iron and manganese oxy-hydroxides in sediments from the Alto Pantanal, Brazil. *Sci Total Environ* 260 (1-3): p. 97-107. (2000).

Junk W. J.; da Cunha C. N.; Wantzen K. M.; Petermann P.; Strüssmann C.; Marques M. I.; Adis J. Biodiversity and its conservation in the Pantanal of Mato Grosso, Brazil. *Aquatic Sciences*, 68(3): 278-309. (2006).

Junk W. J.; Piedade M. T. F.; Schöngart J.; Cohn-haft M.; Adeney J. M.; Wittmann F. A classification of major naturally-occurring Amazonian lowland wetlands. *Wetlands* 31: 623-640. (2011).

Kuzyakov Y.; Blagodatskaya E. Microbial hotspots and hot moments in soil: concept & review. *Soil Biol. Biochem.* 83, 184–199 (2015).

Lacerda L. D.; Ribeiro Jr. M. G.; Souza M.; Ayres G. A. Distribuição de Mercúrio em Solos e Sedimentos Lacustres na Região de Alta Floresta, MT. In: SérieTecnologiaAmbiental. Vol. 23.CETEM/MCT; (1999).

Lane D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M., eds., John Wiley and Sons, New York, NY, pp. 115-175. (1991).

Ladd J. N.; et al. Soil structure and biological activity. Vol. 9 (In: G. Stotzky and J.-M. Bollag (eds) *Soil Biochemistry*, Marcel Dekker, New York: p. 23–78. (1996).

Lauber, C. L., Strickland, M. S., Bradford, M. A. & Fierer, N. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil. Biol. Biochem.* 40, 2407–2415, (2008).

Lauber C.; Knight R.; Hamady M.; Fierer N. Soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale: a pyrosequencing-based assessment. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5111–5120 (2009).

Lladó S.; López-Mondéjar R.; Baldrian P. Drivers of microbial community structure in forest soils. *Appl Microbiol Biotechnol.* Mar 30 (2018).

Li Y.; Kong Y.; Teng D.; Zhang X.; He X.; Zhang Y.; Lv G. Rhizobacterial communities of five co-occurring desert halophytes. *PeerJ.* 6. e5508. 10.7717/peerj.5508. (2018).

Li W.; Lv X.; Ruan J.; Yu M.; Song Y.B.; Yu J.; Dong M. Variations in Soil Bacterial Composition and Diversity in Newly Formed Coastal Wetlands. *Frontiers in microbiology*, 9, 3256. (2019).

Lynch M. D. J.; Neufeld J. D. Ecology and exploration of the rare biosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 217–229 (2015).

Ma Y.; Li J.; Wu J.; Kong Z.; Feinstein L. M.; Ding X.; Ge G.; Wu L. Bacterial and Fungal Community Composition and Functional Activity Associated with Lake Wetland Water Level Gradients. *Scientific Reports* 2045-2322 (2018).

Mercante M. A.; Rodrigues S. C.; Ross J. L. Geomorphology and habitat diversity in the Pantanal. *Braz J Biol*, 71 (1 Suppl 1): p. 233-40. (2011).

Mikk Espenberg, Marika Truu, Ülo Mander, Kuno Kasak, Hiie Nõlvak, Teele Ligi, Kristjan Oopkaup, Martin Maddison & Jaak Truu Differences in microbial

community structure and nitrogen cycling in natural and drained tropical peatland soils. *Scientific Reports* volume 8, Article number: 4742(2018)

Miranda C. S.; Gamarra R. M.; Mioto C. L; Silva N. M.; Conceição Filho A. P. and Pott A. Analysis of the landscape complexity and heterogeneity of the Pantanal wetland. *Braz. J. Biol.* vol. 78, no. 2, pp. 318-327. (2018).

MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughputEdgar, 2004

Lombard N.; Prestat E.; Elsas J. D. V.; Simonet P.; Soil-specific limitations for access and analysis of soil microbial communities by metagenomics, *FEMS Microbiology Ecology*, Volume 78, Pages 31–49. October (2011).

Shmuel Bar. N.; Rogovin E.; Rachmilevitch S.; Friedman A. L. L.; Hoffmann O. S. I.; Rosenberg T.; Behar A.; Shavit R.; Meng F.; Segoli M. Tripartite symbiosis of plant-weevil-bacteria is a widespread phenomenon in the Negev Desert. *Scientific Reports* volume 8, Article number: 2420 (2018)

O'Brien S. L.; *et al.* Spatial scale drives patterns in soil bacterial diversity. *Environ. Microbiol.* 18, 2039–2051 (2016).

O'Donnell, A. G. G. 16S rDNA methods in soil microbiology. *Current Opinion In Biotechnology*. 10: p. 225-229. (1999).

Pajares S.; Campo J.; Bohannan B. J. M.; Etchevers J. D. Environmental Controls on Soil Microbial Communities in a Seasonally Dry Tropical Forest. *Appl Environ Microbiol.* 84(17). pii: e00342-18. Aug 17; (2018) doi: 10.1128/AEM.00342-18. Print 2018 Sep 1.

Parks D. H.; Beiko R. G. Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities. *Bioinformatics*. 26(6): p. 715-721. (2010).

Paul D.; Kumbhare S. V.; Mhatre S. S.; Chowdhury S. P.; Shetty S. A.; Marathe N. P.; Bhute S.; Shouche Y. S. Exploration of Microbial Diversity and Community Structure of Lonar Lake: The Only Hypersaline Meteorite Crater Lake within Basalt Rock. *Front Microbiol*. (2016).

Pereira G.; Chávez E. S.; Silva M. E. S. O estudo das unidades de paisagem do bioma Pantanal. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais – DSR, INPE – Brasil. *Revista Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*: v. 7, n. 1, (2012).

Philippot L.; Raaijmakers J. M.; Lemanceau P.; Van der Putten W. H. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 789–799 (2013).

Pott V. J.; Pott A.; Lima L. C. P.; Moreira S. N.; Oliveira, A. K. M. Aquatic macrophyte diversity of the Pantanal wetland and upper basin. *Braz. J. Biol.*, vol. 71, no. 1 (suppl.), p. 255-263 (2011).

QIIME: Caporaso J. G.; *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods* 7.5 (2010): 335-336.

Santos S. T. dos; Direito I. C. N.; Teixeira K. R. dos S. Isolamento e amplificação de DNA de amostras de solo como ferramenta para avaliar a diversidade das populações de bactérias em solos Agrícolas. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 36p. Jun (2002).

Segata N.; Izard J.; Waldron L.; Gevers D.; Miropolsky L.; Garrett W. S.; Huttenhower C. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome biology*, 12(6), R60. doi:10.1186/gb-2011-12-6-r60 (2011).

Sexstone A. J.; Revsbech N. P.; Parkin T. B.; Tiedje J. M. Direct measurement of oxygen profiles and denitrification rates in soil aggregates. This study provides direct evidence that individual soil aggregates with diameters of just a few centimetres or less can have anaerobic microsites that contain active denitrifiers. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 49, 645–651 (1985).

Smoot M.E.; et al. Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization *Bioinformatics*. 27: p. 431-432. (2011).

Torsvik, V.; et al., Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 56(3): p. 776-81. (1990).

Torsvik V.; Ovreas L.; Thingstad T. F.; Prokaryotic diversity – magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science* 296: 1064–1066. (2002).

Tripathi B. M.; Song W.; Slik J. W. F.; Sukri R. S.; Jaafar S.; Dong K.; Adams J. M.; Distinctive Tropical Forest Variants Have Unique Soil Microbial Communities, But Not Always Low Microbial Diversity. *Frontiers in Microbiology*. (2016).

Turner S.; Pryer K.M.; Miao V.P.W.; Palmer J.D.; Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 46: 327–338. (1999).

UPARSE: Edgar R. C. highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature methods* 10.10 (2013): 996-998.

Valenzuela E. I.; Prieto-Davó A.; López-Lozano N. E.; Hernández-Eligio A.; Vega-Alvarado L.; Juárez K.; García-González A. S.; López M. G.; Cervantes F. J. Anaerobic Methane Oxidation Driven by Microbial Reduction of Natural Organic Matter in a Tropical Wetland. *Appl Environ Microbiol.* doi: 10.1128/AEM.00645-17. May (2017).

Vargas, M.A. and M. Hungria, Biología dos solos dos Cerrados. Planaltina: Embrapa- CPAC: p. 524. (1997).

Vieira C. K.; Borges L. G. A.; Marconatto L.; Giongo A.; Stürmer S. L. Microbiome of a revegetated iron-mining site and pristine ecosystems from the Brazilian Cerrado. *Applied Soil Ecology*. Elsevier. Volume 131, Pages 55-65. October (2018).

Roeland L. Berendsen G.; Vismans K.; Yu Y.; Song R.; Jonge W. P.; Burgman M.; Burmølle J.; Herschend P.; Bakker A. H. M.; Corné M. J. P. Disease-induced assemblage of a plant-beneficial bacterial consortium. *The ISME Journal* (2018).

Rousk J.; Brookes P. C.; Baath E. Investigating the mechanisms for the opposing pH relationships of fungal and bacterial growth in soil. *Soil Biol Biochem* 42: 926–934. (2010).

Smoot M. E., et al., Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization *Bioinformatics*. 27: p. 431-432. (2011).

UCHIME: Edgar Robert C.; *et al.* UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27.16 (2011): 2194-2200.

Voříšková, J. & Baldrian, P. Fungal community on decomposing leaf litter undergoes rapid successional changes. *Isme Journal* 7, 477–486 (2013).

Wang Y. Li.; Wang Q.; Yuan R.; Sheng X. F.; He L. Y. Isolation and characterization of mineral-dissolving bacteria from different levels of altered mica schist surfaces and the adjacent soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 35: 2. (2018 a).

Wang H.; Teng C.; Li H.; Sun X.; Jiang C.; Lou L.; Yue C.; Zhang Z. Microbial community shifts trigger loss of orthophosphate in wetland soils subjected to experimental warming. *Plant and Soil.*, Volume 424, pp 351–365 (2018 b).

White, James Robert, Niranjan Nagarajan, and Mihai Pop. Statistical methods for detecting differentially abundant features in clinical metagenomic samples. *PLoS computational biology* 5.4 (2009): e1000352.

Wolfe J. M.; Fournier G. P. Horizontal gene transfer constrains the timing of methanogen evolution. *Nature Ecology & Evolution* (2018).

Wright D. A.; Killham K.; Glover L. A.; Prosser J. I. The effect of location in soil on protozoal grazing of a genetically modified bacterial inoculum. *Geoderma* 56: 633–640. (1993).

Wrighton K. H. Antibacterial drugs: Discovering antibiotics through soil metagenomics. *Nature Reviews Drug Discovery*. (2018).

Zhang H.; Zheng S.; Ding J.; Wang O.; Liu F. Spatial variation in bacterial community in natural wetland-river-sea ecosystems. *J Basic Microbiol*:536-546. Jun;57(6) (2017).

Zhang J.; Jiao S.; Lu Y. Biogeographic distribution of bacterial, archaeal and methanogenic communities and their associations with methanogenic capacity in Chinese wetlands. *Science of The Total Environment*. Elsevier. (2018 a).

Zhang Y.; Ren B.; Chen B.; Thiele J.; Shi R.; Bu R. Soil pH and plant diversity shape soil bacterial community structure in the active layer across the latitudinal gradients in continuous permafrost region of Northeastern China *Scientific Reports* volume 8, Article number: 5619. (2018 b).

Zheng B. X.; Zhang D. P.; Wang Y.; Hao X. L.; Wadaan M. A. M.; Hozzein W. N.; Penuelas J.; Zhu Y. G.; Yang X. R. Responses to soil pH gradients of inorganic phosphate solubilizing bacteria community. *Scientific Reports* volume 9, Article number: 25 (2019)