

PROD. TEC. ITV DS / N017/2019

DOI: 10.29223/PROD.TEC.ITV.DS.2019.17.Trindade

PRODUÇÃO TÉCNICA ITV DS

METAPROTEÔMICA COMPARATIVA DE SOLOS DE UM GRADIENTE TEMPORAL DE RECUPERAÇÃO

Felipe Costa Trindade

Lana Patricia da Silva Fonseca

Markus Gastauer

Guilherme Oliveira

Rafael Borges da Silva Valadares

Belém/PA

Novembro/2019

Título: Metaproteômica comparativa de solos de um gradiente temporal de recuperação	
PROD. TEC. ITV DS - N017/2019	Revisão 00
Classificação: () Confidencial () Restrita () Uso Interno (X) Pública	

Informações Confidenciais - Informações estratégicas para o Instituto e sua Mantenedora. Seu manuseio é restrito a usuários previamente autorizados pelo Gestor da Informação.

Informações Restritas - Informação cujo conhecimento, manuseio e controle de acesso devem estar limitados a um grupo restrito de empregados que necessitam utilizá-la para exercer suas atividades profissionais.

Informações de Uso Interno - São informações destinadas à utilização interna por empregados e prestadores de serviço

Informações Públicas - Informações que podem ser distribuídas ao público externo, o que, usualmente, é feito através dos canais corporativos apropriados

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

T832

Trindade, Felipe Costa

Metaproteômica comparativa de solos de um gradiente temporal de recuperação / Felipe Costa Trindade, Lana Patricia da Silva Fonseca, Markus Gastauer, Guilherme Oliveira, Rafael Borges da Silva Valadares. -- Belém, 2019.

38 f.: il.

1. Metaproteômica - Recuperação do solo. 2. RAD - Floresta Nacional (FLONA) de Carajás - Parauapebas (PA). 3. Metaproteômica -Monitoramento ambiental. I. Fonseca, Lana Patricia da Silva. II. Gastauer, Markus. III. Oliveira, Guilherme. IV. Valadares, Rafael Borges da Silva. V. Título.

CDD 23. ed. 581

Bibliotecária responsável: Nisa Gonçalves - CRB 2 - 525

RESUMO EXECUTIVO

A recuperação de áreas degradadas (RAD) na mineração é condição obrigatória para que esta atividade continue a ocorrer de maneira sustentável. A metaproteômica é uma técnica que permite a identificação de peptídeos e proteínas sintetizadas por organismos do solo. A partir de análises de cromatografia líquida e espectrometria de massas de alta resolução, a metaproteômica permite mapear, quantificar e comparar funções bioquímicas e rotas metabólicas mais abundantes no ambiente, além de mostrar quais são os organismos mais ativos. A análise profunda da atividade biológica do solo contribui significativamente para inferir o status de recuperação do solo. Neste trabalho foram comparados o metaproteoma de um gradiente de áreas em recuperação, *i.e.*, solo exposto, 4, 12 e 14 anos após a intervenção e um solo de floresta nativa adjacente como referência. Foram identificadas até 9 vezes mais proteínas nos solos recuperados em comparação com o solo exposto, além da retomada de processos importantes como os envolvidos na ciclagem de carbono e nitrogênio do solo. A área em recuperação de 12 anos atingiu os menores níveis de estresse biológico e maior similaridade filogenética bacteriana com a área nativa de referência. Sobretudo a metaproteômica se mostrou uma ferramenta poderosa para o monitoramento ambiental de áreas em recuperação, podendo auxiliar a tomada de decisão de procedimentos utilizados em RAD.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Aspecto geral das áreas de RAD e área nativa amostradas no Arenito 2. (A) RI com aproximadamente quatro anos de revegetação, representando estágio inicial; (B) RA12, representando estágio avançado de 12 anos de revegetação; (C) RA14, enriquecido com arbustos de jaborandi, representando estágio avançado de 14 anos de revegetação; (D) SN: solo de floresta nativa (floresta ombrófila densa) como área de referência.	09
Tabela 1 -	Valores médios de variáveis ambientais analisadas neste trabalho referentes a cada status de recuperação.	10
Figura 2 -	Quantidade de proteínas identificadas por área. As barras mostram o valor médio de proteínas identificado por área. Dados seguidos da mesma letra não diferem significativamente de acordo com o Teste de Tukey ($p < 0,05$).	13
Figura 3 -	Heatmap e agrupamento das áreas a partir da abundância de peptídeos entre os filos bacterianos. Quanto mais vermelha a caixa maior é a abundância, caixa branca significa abundância intermediária e quanto mais azul a caixa menor a abundância de peptídeos.	15
Figura 4 -	Abundancia relativa de peptídeos (%) associados aos filos Proteobacteria e Firmicutes nos solos em recuperação, solo exposto e solo nativo (referência).	16
Figura 5 -	Diagrama de Venn apresentando o número processos biológicos (níveis 2, 3 e 4) identificados por área.	17
Figura 6 -	Correlograma de valores de variáveis ambientais versus quantidades de proteínas em processo de biossíntese (GO 0009058), processo de catabolismo (GO: 0009056) e resposta ao estresse (GO: 0006950). Caixas cinzas representam valores significativos a $p < 0,05$	19
Tabela 2 -	Exemplos de oxidoredutases e hidrolases identificadas na metaproteômica de RAD.	20
Figura 7 -	Número de peptídeos associados ao ciclo global do carbono e enzimas com atividade oxidoredutase, importantes para o metabolismo energético microbiano. Observa-se uma tendência de incremento destes de acordo com o avanço dos estágios de recuperação.	21

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

EC – Enzyme Commission number

FLONA – Floresta Nacional de Carajás

GO – Gene Ontology

IAF – Índice de Área Foliar

LCA – Lowest Common Ancestor (menor ancestral comum)

MOS – Matéria Orgânica do Solo

RA12 – Recuperação Avançada com 12 anos de revegetação

RA14 – Recuperação Avançada com 14 anos de revegetação

RAD – Recuperação de Áreas Degradadas

RI – Recuperação Inicial com 4 anos de revegetação

SE – Solo Exposto

SN – Solo Nativo de referência

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

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	07
2	OBJETIVO	08
2.1	GERAL	08
2.2	ESPECÍFICOS	08
3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	08
3.1	LOCAL DE COLETA E AMOSTRAGEM	08
3.2	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	10
3.3	DIGESTÃO DE PROTEÍNAS E TRATAMENTO DAS AMOSTRAS	11
3.4	2D-UPLC-MSE	11
3.5	BIOINFORMÁTICA	12
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	12
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
4.1	VISÃO GERAL DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS	13
4.2	DIVERSIDADE BASEADA EM PEPTÍDEOS E ABUNDÂNCIA DE GRUPOS BACTERIANOS AO LONGO DA RECUPERAÇÃO	14
4.3	CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS	15
4.4	ENZIMAS DO SOLO, CICLAGEM DE C E ATIVIDADE MICROBIANA	19
5	CONCLUSÃO	20
	REFERÊNCIAS	21
	APÊNDICES	25

1 INTRODUÇÃO

Apesar dos benefícios sociais e econômicos, a mineração pode alterar drasticamente a paisagem, tendo em vista a completa supressão da vegetação, remoção das camadas de topsoil e eventuais contaminações do solo por resíduos tóxicos (LOSFELD *et al.*, 2015). Leis ambientais no Brasil requerem medidas de compensação para impactos na biodiversidade e nos recursos naturais (GASTAUER *et al.*, 2018a). A recuperação de uma área minerada é bem-sucedida quando ecossistemas saudáveis e autossustentáveis se desenvolvem em áreas anteriormente mineradas (GARRIS *et al.*, 2016), também o sucesso da recuperação pode ser medido comparando diferentes estágios de recuperação com áreas nativas como referência (GASTAUER *et al.*, 2018b).

É discutido em Gastauer *et al.* (2018b) a influência de filtros ambientais e interações interespecíficas em comunidades em sucessão ecológica, a importância da biodiversidade para maior resiliência e resistência a perturbações e as estratégias adotadas em RAD. Entre essas estratégias, o uso de topsoil pode ser utilizado em projetos de RAD para promover aumento do conteúdo de matéria orgânica do solo (MOS), melhoria das condições físico-químicas do solo e incrementar a biodiversidade, acelerando a sucessão vegetal nessas áreas (BORUVKA *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2018).

Diante da complexidade do processo de recuperação de áreas mineradas, a metaproteômica pode ser uma ferramenta útil no monitoramento ambiental dessas áreas (GASTAUER *et al.*, 2018b), auxiliando na avaliação da recuperação da comunidade microbiana do solo, que é uma etapa crucial na recuperação de solos degradados (LI *et al.*, 2014). A metaproteômica descreve o perfil de proteínas identificadas de organismos presentes no solo (BISWAS; SARKAR, 2018). Uma vez que as proteínas são moléculas responsáveis por atividades funcionais em um organismo, diversas informações podem ser acessadas sobre vias metabólicas, mecanismos de defesa, energia metabólica e interações microrganismos-planta (BASTIDA; JEHLICH, 2016; MATTAROZZI *et al.*, 2017).

Embora não tenhamos conhecimento sobre nenhum trabalho de metaproteômica de solo realizado em áreas em recuperação, com o intuito de gerar dados de monitoramento ambiental, é possível observar em Bastida, Hernandez e García (2014) e Malik *et al.* (2018) acúmulo diferencial de proteínas e processos sendo relacionados a gradientes de MOS, nutrientes e cobertura vegetal, por exemplo. Nesse sentido, este trabalho é uma tentativa inédita de identificar e monitorar proteínas e processos executados pelas mesmas, como

respostas metabólicas de organismos do solo aos gradientes ambientais encontrados nos distintos status de recuperação.

2 OBJETIVO

2.1 GERAL

Demonstrar a utilização da metaproteômica como ferramenta para o monitoramento ambiental de áreas em recuperação.

2.2 ESPECÍFICOS

Analisar o metaproteoma de solos de uma área de floresta nativa e comparar com solos em distintos estágios de recuperação.

Verificar o grau de similaridade taxonômica e funcional entre as áreas em recuperação e a floresta nativa.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 LOCAL DE COLETA E AMOSTRAGEM

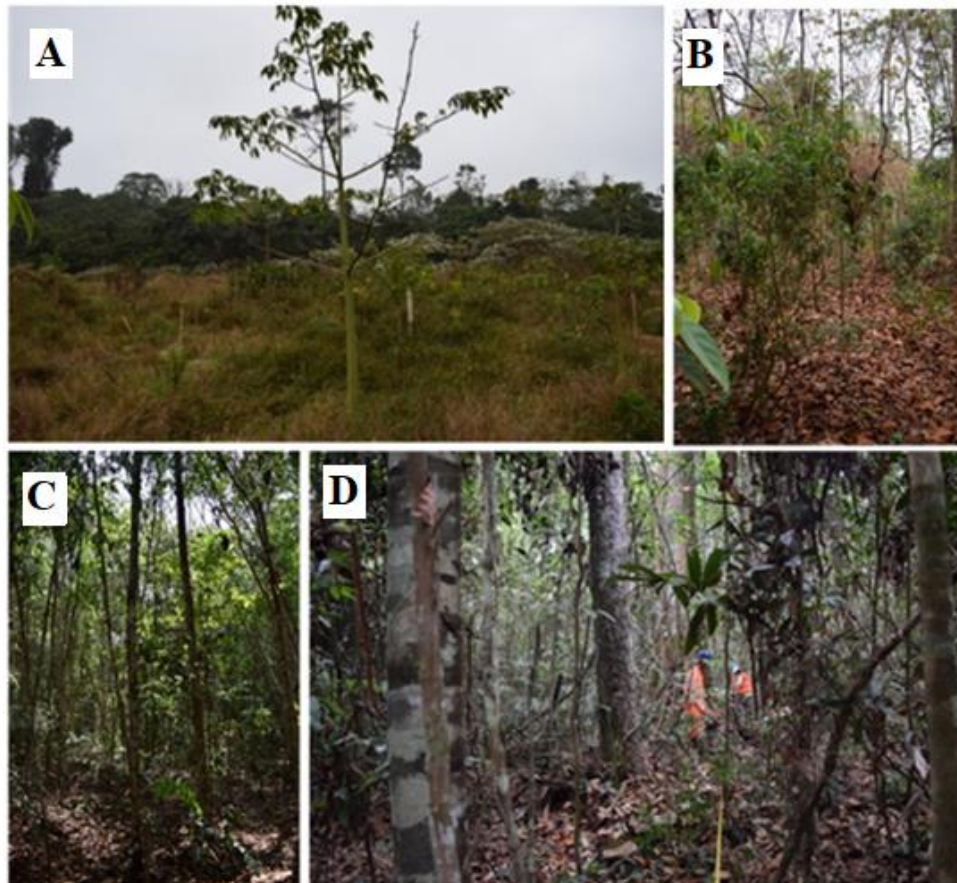
As amostragens foram conduzidas em áreas de RAD e nas matas nativas que circundam a mineração de ferro, na Floresta Nacional (FLONA) de Carajás, em Parauapebas – PA, Brasil. O clima da região é tropical quente, com estação seca entre junho e setembro. Os tipos de solos mais abundantes são Latossolos,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

Os Arenitos, situados entre a Mina de Manganês e as minas do Complexo Vale Ferrosos Carajás, representam três cavas de extração de areia, que após o fim da exploração foram preenchidas com estéril da Mina de Granito, situada ao Sul dos Arenitos. Após preenchimento das cavas, as áreas foram aplainadas; para sua revegetação foram utilizados topsoil, plantio de mudas e semeadura de espécies nativas (VALE - Relatório Interno, 2018). Foi removida uma camada de 50 cm de topsoil (incluindo a camada orgânica e liteira) de área coberta por floresta densa, similar à referência da recuperação. Depois da supressão da vegetação, para evitar degradação do topsoil aplicado, 30 cm deste foi de imediato homogeneamente distribuído com trator de esteira. O topsoil possuiu baixo conteúdo de

nutrientes, especialmente P, Ca e Mg, e necessitou de correção para otimizar o crescimento de plantas (GASTAUER *et al.*, 2019, no prelo¹).

As áreas em estudo do Arenito 2 (figura 1) estão aproximadamente localizadas a 6°2'0''S e 50°14'0''O. A amostragem dos solos foi realizada na profundidade de 0-10 cm em três parcelas de 10 x 20 m, totalizando três amostras (três repetições) para cada área. Para a análise metaproteômica, as amostras das três parcelas foram homogeneizadas compondo uma amostra composta por ambiente, que foi analisada em triplicata. A coleta foi feita em período chuvoso em abril de 2018.

Figura 1 - Aspecto geral das áreas de RAD e área nativa amostradas no Arenito 2. (A) RI com aproximadamente quatro anos de revegetação, representando estágio inicial; (B) RA12, representando estágio avançado de 12 anos de revegetação; (C) RA14, enriquecido com arbustos de jaborandi, representando estágio avançado de 14 anos de revegetação; (D) SN: solo de floresta nativa (floresta ombrófila densa) como área de referência.



Fonte: Relatório interno da Vale, (2018).

¹ Active rehabilitation of Amazonian sand mines converges soils, plant communities and environmental status to pre-disturbance levels. **Land degradation & development**, autoria de Markus Gastauer; Cecílio Caldeira; Silvio Ramos; D. Silva; José Siqueira, 2019 (no prelo).

A MOS foi medida pelo método dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$). O índice de área foliar (IAF) foi calculado como uma medida indireta do fechamento do dossel em cada parcela dos locais de recuperação e referência. Para fazer isso foi utilizado um LAI-2200C (LI-COR INC., Lincoln, NE, USA) seguindo as instruções do fabricante, em que as leituras acima do dossel (condições do céu) foram medidas continuamente por um sensor em um local livre de vegetação; um segundo sensor foi usado para capturar duas leituras abaixo do dossel em cada canto e no centro de cada parcela, *i.e.*, 10 leituras abaixo do dossel para cada parcela. As leituras abaixo do dossel foram realizadas um metro acima da superfície do solo. A temperatura do solo foi medida com o sistema LI-6400 (LI-COR Inc.). Valores médios das variáveis ambientais representativas de recuperação estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1 - Valores médios de variáveis ambientais analisadas neste trabalho referentes a cada status de recuperação.

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

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

Fonte: próprio autor, (2019).

3.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

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

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

3.3 DIGESTÃO DE PROTEÍNAS E TRATAMENTO DAS AMOSTRAS

Cinquenta microgramas de proteínas foram utilizados por amostra, e estas foram completadas com rapigest (Waters, Millford) a 0,1% para um volume final de 100 µL. A preparação da digestão envolveu a redução de proteínas com ditioneitol (DTT, 5 mM) e incubação por 25 minutos a 56 °C, seguida da alquilação com iodoacetamida (IAA, 14 mM) por 30 minutos a temperatura ambiente. Iodoacetamida residual foi removida ao adicionar DTT (5 mM) e incubar por 15 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram diluídas em 1:5 com bicarbonato de amônio, seguidas da adição de CaCl₂ (1 mM) e tratamento com tripsina (20 ng/µL) por 16 horas a 37 °C. Subsequentemente, ácido trifluoroacético foi adicionado para uma concentração final de 0.4% para parar a reação enzimática.

Após as amostras ficarem incubadas a 37 °C por 90 minutos, estas foram então centrifugadas a 14000 rpm, 6 °C por 30 minutos. Feito isto, as amostras foram secas em concentrador a vácuo e ressuspendidas em 50 µL de formiato de amônio (10 mM) e então injetadas no cromatógrafo líquido 2D de ultra performance acoplado ao espectrômetro de massas (2D-UPLC-MS).

3.4 2D-UPLC-MSE

O cromatógrafo Nano Acquity UPLC (Waters) foi configurado para um fracionamento em duas dimensões; na primeira dimensão, uma coluna analítica de 5 µm XBridge BEH130 C18 (300 µm x 50 mm) em um fluxo de 2 µL por minuto; e na segunda dimensão uma coluna trap C18, 5 µm (180 µm x 20 mm), acoplada a uma coluna analítica 1.7 µm BEH130 C18 µm (100 µm x 100 mm) em um fluxo de 400 nL.min⁻¹. As amostras foram separadas em 5 frações a partir de um gradiente de 10.8; 14.0; 16.7; 20.4; e 65.0 % de acetonitrila. O cromatógrafo opera acoplado diretamente a um espectrômetro de massas ESI-Q-ToF Synapt G2S (Waters) configurado para operar em modo positivo, e fragmentação contínua (MS^E) com a energia de colisão oscilando entre 5 a 40 eV.

3.5 BIOINFORMÁTICA

Os dados brutos foram processados utilizando Proteinlynx Global Server 3.0.2. (PLGS). As buscas foram também realizadas no PLGS contra uma base de dados do UniprotKB composta por sequências de Bactérias, Plantas e Fungos (Bactéria: 336 171 sequências; Plantas: 6 347 e Fungos: 33 362). Carbamidometilação no C-terminal (+57) foi definido como modificação fixa e modificações variáveis foram definidas como a seguir: -1Da em (Amidação+C-Terminal), +1Da em N (Desaminado), +16Da em M (Oxidação), +80Da em (Fosforil+STY), +98Da em STY (Fosforil STY). A tolerância do íon fragmentado e do íon parental foi definida como automático e a Taxa de Falsa Descoberta (FDR) foi calculada pelos algoritmos PeptideProphet e ProteinProphet (Nesvizhskii et al., 2003). Peptídeos foram aceitos quando FDR calculada foi menor do que 6.6% e proteínas menor do que 3.3%.

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

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

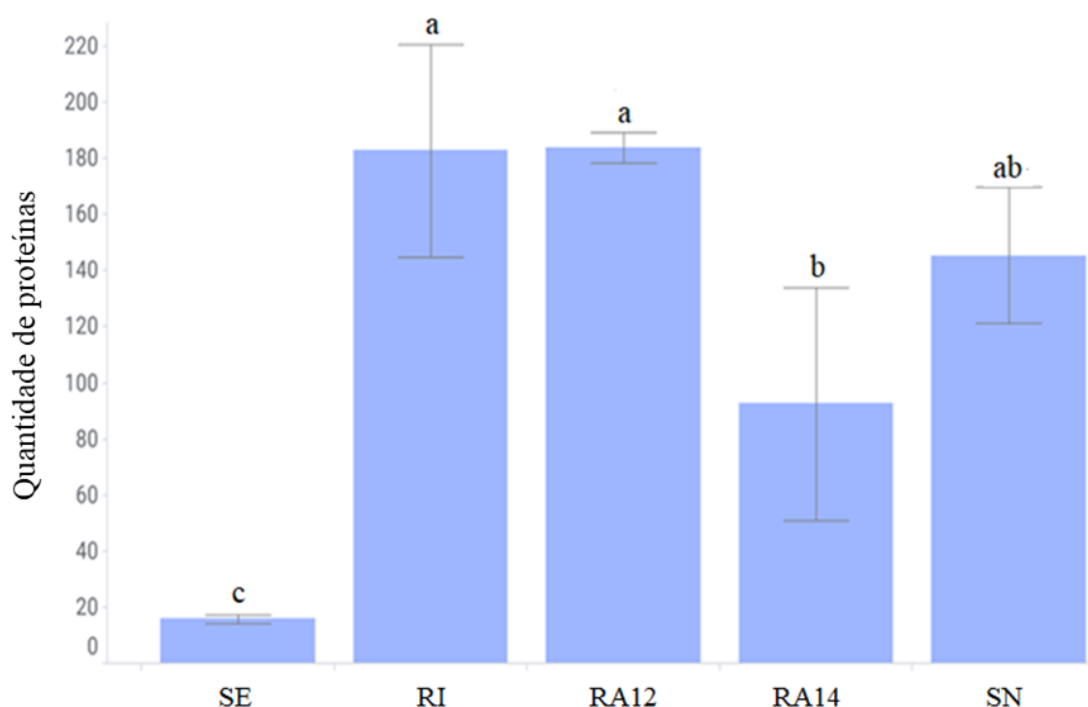
Para verificar diferenças significativas da quantidade de proteínas identificadas entre as amostras, foi realizada a one-way ANOVA seguida pelo teste post-hoc de tukey com $p < 0,05$, através da ferramenta encontrada em <http://statpages.info/anova1sm.html>. O diagrama de Venn foi construído por meio da ferramenta obtida em <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>. Para realizar o agrupamento das amostras, a partir da abundância de peptídeos entre os filos bacterianos, foi utilizado o Método de Associação Média (UPGMA, em inglês), utilizando a distância euclidiana. Através do software Past 3 foi feita a análise de correlação utilizando-se o coeficiente de correlação de Pearson.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 VISÃO GERAL DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS

O número de proteínas identificadas por área (Figura 2) mostra até 9 vezes mais proteínas na área com 4 anos de recuperação (RI) em relação ao solo exposto (SE). As áreas em recuperação de 4, 12 e 14 anos não diferem significativamente da área nativa SN ($p < 0,05$). Isto já é um sinal evidente do efeito positivo da intervenção das áreas mineradas para a recuperação da atividade biológica do solo, tendo em vista que a maior diversidade de proteínas está diretamente relacionada ao número de processos que os organismos do solo estão promovendo.

Figura 2 - Quantidade de proteínas identificadas por área. As barras mostram o valor médio de proteínas identificado por área. Dados seguidos da mesma letra não diferem significativamente de acordo com o Teste de Tukey ($p < 0,05$).



Fonte: próprio autor, (2019).

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

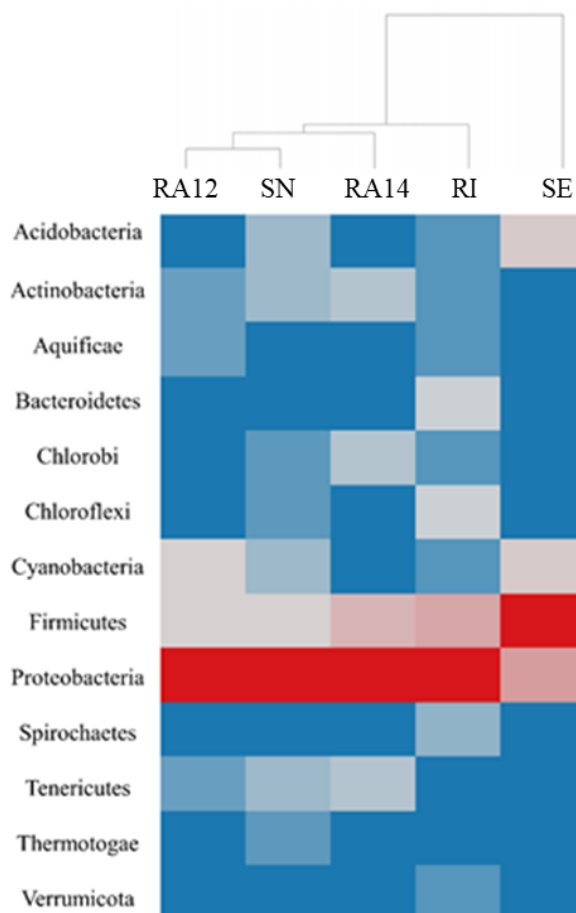
4.2 DIVERSIDADE BASEADA EM PEPTÍDEOS E ABUNDÂNCIA DE GRUPOS BACTERIANOS AO LONGO DA RECUPERAÇÃO

A análise metaproteômica através do Unipept permite, entre outras funcionalidades, observar a classificação taxonômica dos peptídeos identificados e a abundância de peptídeos para cada grupo taxonômico (MESUERE *et al.*, 2015). Em relação a peptídeos de bactérias, 14 filos foram identificados (Figura 3). Merecem destaque os filos Proteobacteria e Firmicutes que são representados em todas as áreas, sendo Proteobacteria o mais representativo dos filos, a exceção do SE, no qual Firmicutes tem maior número de peptídeos identificados.

Os filos Chlorobi, Tenericutes e Actinobacteria completam os filos identificados em RA14, os quais são também encontrados na área de referência. Em Sun et al. (2018) foi verificada maior predominância do filo Chlorobi em rejeitos da mineração de cobre revegetados, do que no rejeito não recuperado. Tenericutes foi detectado apenas em florestas e campos nativos se comparados a diferentes áreas em recuperação de mineração de carvão, no Sul brasileiro (QUADROS *et al.*, 2015). Bactérias do filo Actinobacteria são mediadores importantes na degradação de lignina e na formação de húmus (EISENLORD; ZAK, 2010). Desse modo, sugere-se a importância desses filos na recuperação da microbiota dos solos em recuperação.

O agrupamento baseado na abundância relativa de peptídeos (Figura 3) mostra maiores semelhanças de filos bacterianos entre os solos das áreas RA14 e RA12 com o SN (referência). No dendrograma acima do heatmap se observa a formação de um grande grupo contendo as áreas recuperadas e a área referência, sendo o solo exposto a amostra mais dissimilar. Dentre as áreas em recuperação, as áreas de 12 e 14 anos são mais similares à área nativa. Ao longo da recuperação (de RI para RA14), parte da população microbiana deve ter sido selecionada em favor de filos mais adaptados às condições locais, se assemelhando cada vez mais com os solos nativos.

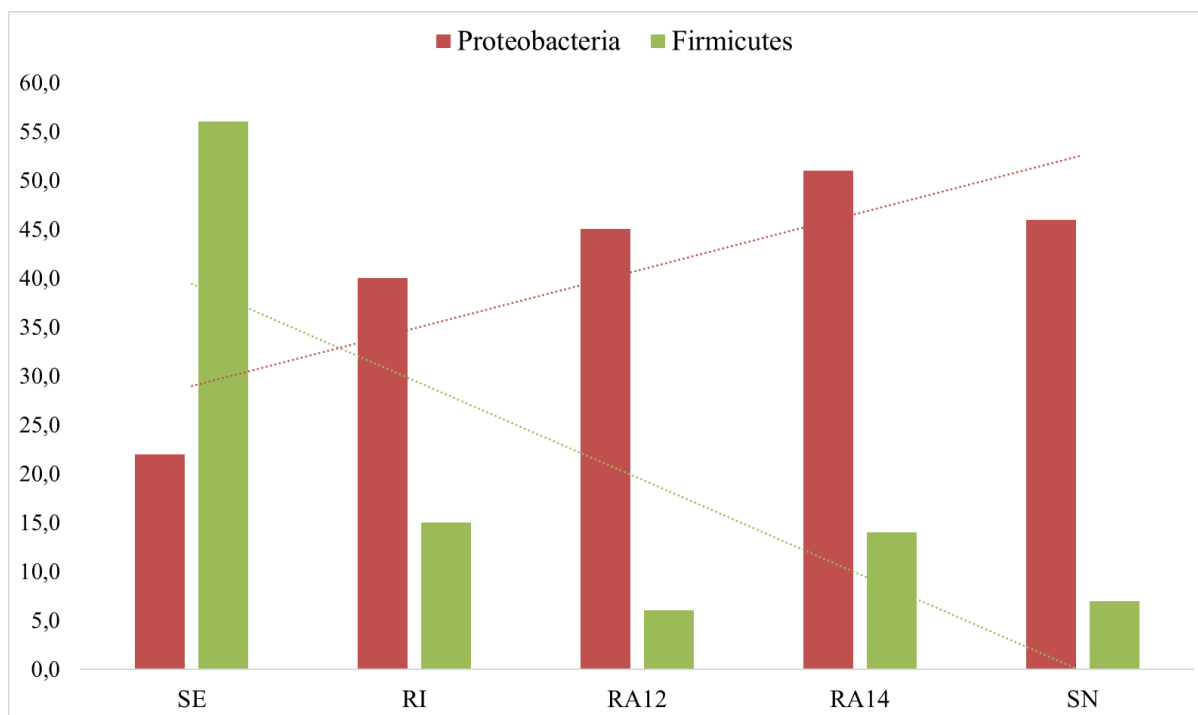
Figura 3 - Heatmap e agrupamento das áreas a partir da abundância de peptídeos entre os filos bacterianos. Quanto mais vermelha a caixa maior é a abundância, caixa branca significa abundância intermediária e quanto mais azul a caixa menor a abundância de peptídeos.



Fonte: próprio autor, (2019).

De acordo com Banning *et al.* (2011), ao longo da recuperação de áreas mineradas, foi observado a tendência de aumento na abundância de bactérias pertencentes ao filo Proteobacteria e redução na abundância de Firmicutes. Ademais, Sun *et al.* (2018) verificaram predominância de Firmicutes em área de rejeito de cobre não recuperado, comparado a áreas com este rejeito revegetadas, onde foi observada maior abundância do filo Proteobacteria. Isto também foi observado no nosso experimento, onde os valores crescentes de Proteobacteria e decrescentes de Firmicutes buscam os valores de referência encontrados no solo nativo (SN) (Figura 4). Nota-se uma tendência de incremento de Proteobacteria, buscando os valores presentes na referência. De maneira oposta, observa-se a tendência na diminuição de peptídeos associados a Firmicutes de acordo com o progresso da recuperação.

Figura 4 - Abundância relativa de peptídeos (%) associados aos filos Proteobacteria e Firmicutes nos solos em recuperação, solo exposto e solo nativo (referência).



Fonte: próprio autor, (2019).

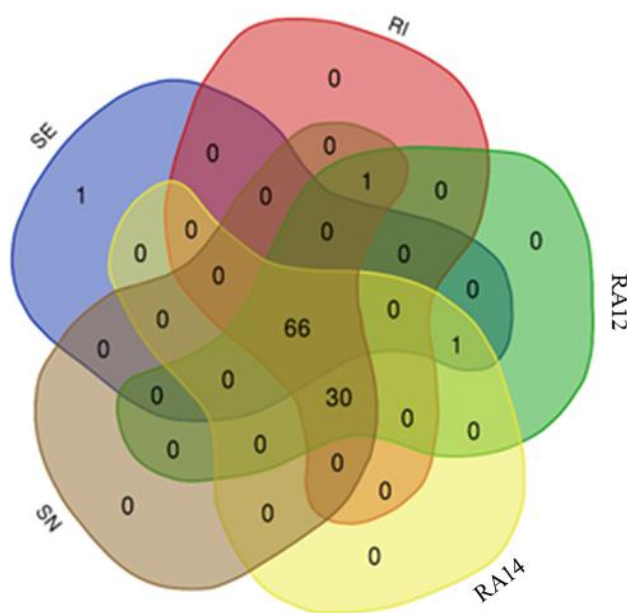
No filo Proteobacteria ocorre a presença de bactérias da classe Betaproteobacteria. Esta classe foi verificada nos solos em recuperação e no nativo, enquanto que no solo exposto, com o menor teor de MOS, não foi verificada presença de bactérias desta classe (Apêndice B – Figura S1). Corroborar com os nossos achados a discussão de Fierer *et al.* (2007) de que a abundância de Betaproteobacteria responde positivamente a maiores conteúdos de MOS.

Além de verificar a presença de determinados organismos do solo, o grande benefício da técnica de metaproteômica é confirmar importantes características ecológicas destes organismos. Isso se deve por ser possível inferir a partir das proteínas identificadas a função que os organismos estão executando no ambiente. Por exemplo, ao encontrar proteínas de resposta a substâncias orgânicas (GO:0010033) e transporte de lipossacarídeos (GO:0015920) podemos verificar como Betaproteobacterias estão de fato respondendo ao incremento de MOS; outro exemplo é encontrar a proteína responsável por esporulação (GO:0030435) em Firmicutes, confirmando a estratégia de resiliência destas bactérias em ambientes críticos (BASTIDA, HERNÁNDEZ e GARCÍA; 2014) como no solo exposto.

4.3 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS

A partir da categorização funcional podemos agrupar as proteínas identificadas em processos biológicos (THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM, 2019), facilitando a interpretação dos dados. O único processo exclusivamente detectado entre as áreas foi no solo exposto, “fotossíntese” (figura 5).

Figura 5 - Diagrama de Venn apresentando o número processos biológicos (níveis 2, 3 e 4) identificados por área.



Fonte: próprio autor, (2019).

Levando em conta a alta exposição do solo à luz solar e o baixo teor de MOS no SE, a fotossíntese bacteriana é fundamental para a incorporação de C e incremento da MOS nesta área, iniciando a sucessão microbiana (BARDGETT; PUTTEN, 2014). A maioria (66) dos processos biológicos são compartilhados entre todas as áreas, e 30 processos biológicos são comuns aos solos de áreas de RAD e Nativo (lista dos processos em Apêndice B – Tabela S1). Isto mostra que já a partir de SE conseguimos detectar grande diversidade de processos metabólicos no solo (apesar da baixa abundância), e que há maior similaridade funcional das áreas de RAD com a área de referência.

Considerando processos comuns as 5 áreas em estudo, chamamos atenção para processos biológicos como “processo de catabolismo” (GO: 0009056), “processo de biossíntese” (GO: 0009058) e “resposta ao estresse” (GO: 0006950). Estes processos já

foram relatados em trabalhos de metaproteômica de solos (BASTIDA; HERNÁNDEZ; GARCÍA, 2014; ZAMPIERI *et al.*, 2016; MATAROZZI *et al.*, 2017) e devem estar intrinsicamente relacionados ao processo de recuperação, tendo em vista que gradientes de variáveis ambientais impactam no acúmulo de proteínas em determinados processos (BASTIDA; HERNÁNDEZ; GARCÍA, 2014; MALIK *et al.*, 2018).

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

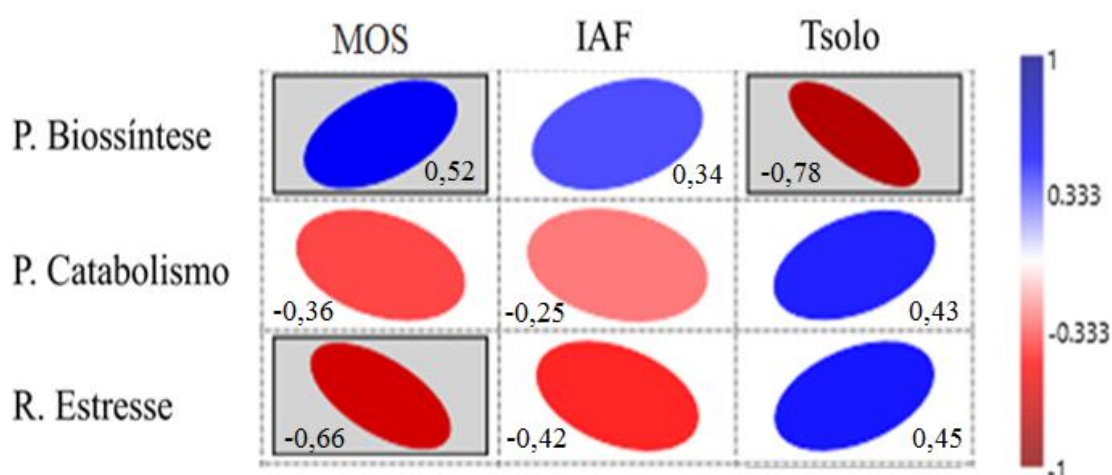
É notável perceber maiores quantidades de proteínas relacionadas a resposta ao estresse (GO: 0006950) em SE e menores relacionadas ao processo de biossíntese (GO 0009058) nessa área (Apêndice B – Tabela S2). Isso mostra a atenuação das condições de estresse aos organismos do solo a partir de RI (4 anos),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

Consideramos que variáveis ambientais representativas de recuperação observadas neste trabalho, *i.e.*, Temperatura do Solo, Índice de Área Foliar, MOS, possam impactar em respostas metabólicas nos organismos do solo. O Índice de Área Foliar influencia no microclima dentro da fitofisionomia, na interceptação da radiação, na troca de água e gás carbônico, sendo, portanto um componente chave nos ciclos biogeoquímicos (BREDA, 2003).

A temperatura do solo em áreas tropicais e subtropicais pode ser um grande problema, um fator de estresse ambiental, para a produção de culturas e colonização microbiana (GROVER *et al.*, 2011). Ainda em Grover *et al.* (2011) é interessante notar que os mecanismos de resposta de plantas e microrganismos ao aumento de temperatura são

proteínas encontradas na metaproteômica de RAD. A MOS é um fator ambiental central na metaproteômica de solos, influenciando no perfil de proteínas identificadas (BASTIDA; HERNANDEZ; GARCÍA, 2014; STARKE; JEHLICH; BASTIDA, 2018) e na quantidade de proteínas recuperadas do solo (STARKE; JEHLICH; BASTIDA, 2018). Em termos quantitativos, podemos observar correlações entre as quantidades de proteínas identificadas nos processos biológicos acima destacados e variáveis ambientais discutidas neste trabalho (Figura 6).

Figura 6 - Correlograma de valores de variáveis ambientais versus quantidades de proteínas em processo de biossíntese (GO 0009058), processo de catabolismo (GO: 0009056) e resposta ao estresse (GO: 0006950). Caixas cinzas representam valores significativos a $p < 0,05$.



Fonte: próprio autor, (2019).

4.4 ENZIMAS DO SOLO, CICLAGEM DE C E ATIVIDADE MICROBIANA

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

Exemplos de oxidoredutases e hidrolases identificadas em nosso trabalho relacionadas à transformação da MOS e ciclagem de nutrientes são apresentadas na tabela 2.

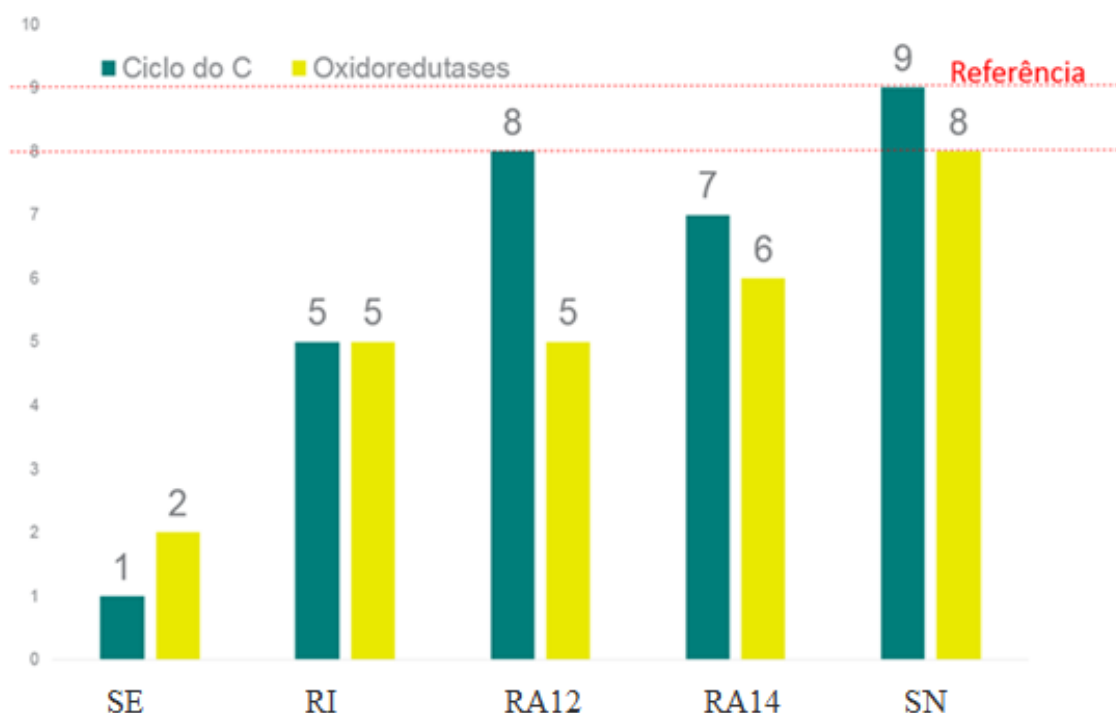
Tabela 2 - Exemplos de oxidoredutases e hidrolases identificadas na metaproteômica de RAD.

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

Fonte: Bastida *et al.* (2014), Zago *et al.* (2016) e Adetunji *et al.* (2017).

As oxidoredutases 1.2.1.12, 1.1.1.40, 1.1.1.42 são espécies de desidrogenases, suas atividades catalíticas de oxidação da matéria orgânica ocorrem no interior celular participando de vias metabólicas. Desidrogenases têm sido utilizadas como um indicador geral de atividade microbiana em solos (BASTIDA; HERNÁNDEZ; GARCÍA, 2014). Através de transformações chave realizadas por hidrolases e oxidoredutases em nutrientes essenciais como C e N, verificamos como organismos do solo reciclam seus componentes orgânicos em um ambiente pobre em MOS. De maneira geral, foi observado um incremento no número de oxidoredutases identificadas e também de enzimas ligadas à ciclagem de carbono, de acordo com o avanço do estágio de recuperação. Novamente, se aproximando dos valores na área referência (figura 7).

Figura 7 - Número de peptídeos associados ao ciclo global do carbono e enzimas com atividade oxidoredutase, importantes para o metabolismo energético microbiano. Observa-se uma tendência de incremento destes de acordo com o avanço dos estágios de recuperação.



Fonte: próprio autor, (2019).

5 CONCLUSÃO

Foram identificadas significativamente mais proteínas nas áreas de recuperação RI, RA12, RA14 e solo nativo do que no solo exposto. Isto mostra o efeito positivo da recuperação das áreas mineradas do ponto de vista bioquímico do solo.

Observou-se maior similaridade de grupos bacterianos entre as áreas avançadas e a área referência (floresta nativa) e tendências semelhantes no número de peptídeos associados aos filos proteobacteria (aumenta com o avanço recuperação) e firmicutes (diminui com o avanço da recuperação), buscando valores semelhantes aos da área de referência em estágios mais avançados.

O número de oxidoredutases e de enzimas ligadas ao ciclo global do C também aumenta de acordo com o avanço da recuperação e se aproxima com o tempo dos valores encontrados na área referência.

Por fim, a partir de RI ocorre grande incremento na quantidade de proteínas do solo em relação a SE, atenuação das condições de estresse e o metabolismo microbiano compatível com o de um ecossistema autossustentável.

REFERÊNCIAS

- ADETUNJI, A. T.; LEWU, F. B.; MULIDZI, R.; NCUBE, B. The biological activities of glucosidase, phosphatase and urease as soil quality indicators: a review. **Journal of soil science and plant nutrition**, v. 17, n. 3, p. 794–807, 2017. DOI 10.4067/S0718-95162017000300018
- BANNING, N. C. *et al.*. Soil Microbial Community Successional Patterns during Forest Ecosystem Restoration. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 17, p. 6158–6164, 2011. DOI 10.1128/AEM.00764-11
- BARDGETT, R. D., PUTTEN, W. H. Belowground biodiversity and ecosystem functioning. **Nature**, v. 515, p. 505-511, 2014. DOI 10.1038/nature13855
- BASTIDA, F.; HERNÁNDEZ, T., GARCÍA, C. Metaproteomics of soils from semiarid environment: Functional and phylogenetic information obtained with different protein extraction methods. **Journal of Proteomics**, v. 101, p. 31-42, 2014. DOI 10.1016/j.jprot.2014.02.006
- BASTIDA, F.; N. JEHLICH. It's all about functionality: How can metaproteomics help us to discuss the attributes of ecological relevance in soil? **Journal of Proteomics**, v. 144, p. 159-161, 2016. DOI 10.1016/j.jprot.2016.06.002
- BAUTISTA-CRUZ, A.; ORTIZ-HERNÁNDEZ, Y. D. Hydrolytic soil enzymes and their response to fertilization: A short review. **Comunicata Scientiae**, v. 6, n. 3, p. 255–262, 2015. DOI 10.14295/cs.v6i3.962
- BORUVKA, L.; KOZÁK, J.; MÜHLHANSELOVÁ, M. *et al.* Effect of covering with natural topsoil as a reclamation measure on brown-coal mining dumpsites. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 113, p. 118-123. 2012. DOI [10.1016/j.gexplo.2011.11.004](https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2011.11.004)
- BRÉDA, N. J. J. Ground-based measurements of leaf area index: A review of methods, instruments and current controversies. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 392, p. 2403–2417, 2003. DOI 10.1093/jxb/erg263
- EISENLORD, S. D.; ZAK, D. R. Simulated Atmospheric Nitrogen Deposition Alters Actinobacterial Community Composition in Forest Soils. **Soil Science Society of America Journal**, v. 74, n. 4, p. 1157, 2010. DOI 10.2136/sssaj2009.0240
- FIERER, N.; NEMERGUT, D.; KNIGHT, R.; CRAINE, J. M. Changes through time: Integrating microorganisms into the study of succession. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 8, p. 635–642, 2010. DOI 10.1016/j.resmic.2010.06.002
- GARRIS, H. W.; BALDWIN, S. A.; HAMME, J. D. VAN; GARDNER, W. C.; FRASER, L. H. Genomics to assist mine reclamation: A review. **Restoration Ecology**, v. 24, n. 2, p. 165–173, 2016. DOI 10.1111/rec.12322

- GASTAUER, M. *et al.* Mine land rehabilitation in Brazil: Goals and techniques in the context of legal requirements. **Ambio**, v. 48, p. 47-88, 2018a. DOI 10.1007/s13280-018-1053-8
- GASTAUER, M. *et al.* Mine land rehabilitation: Modern ecological approaches for more sustainable mining. **Journal of Cleaner Production**, v. 172, p. 1409–1422, 2018b.
- GROVER, M.; ALI, S. Z.; SANDHYA, V.; RASUL, A.; VENKATESWARLU, B. Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 5, p. 1231–1240, 2011. DOI 10.1007/s11274-010-0572-7
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Manual Técnico da Vegetação Brasileira. Rio de Janeiro: IBGE, 2012.
- LI, Y., WEN, H., CHEN, L., YIN, T. Succession of Bacterial Community Structure and Diversity in Soil along a Chronosequence of Reclamation and Re-Vegetation on Coal Mine Spoils in China. **PLOS one**, v. 9: e115024. DOI 10.1371/journal.pone.0115024
- LOSFELD, G.; L'HUILLIER, L.; FOGLIANI, B.; JAFFRÉ, T.; GRISON, C. Mining in New Caledonia: environmental stakes and restoration opportunities. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 8, p. 5592–5607, 2015. DOI 10.1007/s11356-014-3358-x
- MALIK, A. A. *et al.* Land use driven change in soil pH affects microbial carbon cycling processes. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2018. DOI 10.1038/s41467-018-05980-1
- MATTAROZZI, M. *et al.* A metaproteomic approach dissecting major bacterial functions in the rhizosphere of plants living in serpentine soil. **Anal Bioanal Chem**. v. 409, p. 2327-2339, 2017. DOI 10.1007/s00216-016-0175-8
- MESUERE, B. *et al.* The Unipept metaproteomics analysis pipeline. **Proteomics**, 15, 1437–1442, 2015. DOI 10.1002/pmic.201400361
- MESUERE, B. *et al.* High-throughput metaproteomics data analysis with Unipept: A tutorial. **Journal of Proteomics**, v. 171, p. 11–22, 2018. DOI 10.1016/j.jprot.2017.05.022
- MIRALLES, I. *et al.* Hydrolase enzyme activities in a successional gradient of biological soil crusts in arid and semi-arid zones. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 53, p. 124–132, 2012. DOI 10.1016/j.soilbio.2012.05.016
- NESVIZHSKII, A.; KELLER, A.; KOLLER, E.; AEBERSOLD, R. A statisticiam model for identify proteins by tandem mass spectrometry. **Analitical Chemistry**, v. 75, n. 17, p. 4646-4658. 2003. DOI 10.1021/ac0341261
- QUADROS, P. D. de *et al.* Coal mining practices reduce the microbial biomass, richness and diversity of soil. **Applied Soil Ecology**, v. 98, p. 195–203, 2016. DOI 10.1016/j.apsoil.2015.10.016
- RIBEIRO, R. A.; GIANNINI, T. C.; GASTAUER, M.; AWADE, M.; SIQUEIRA, J. O.

Topsoil application during the rehabilitation of a manganese tailing dam increases plant taxonomic, phylogenetic and functional diversity. **Journal of Environmental Management**, v. 227, p. 386–394, 2018. DOI 10.1016/j.jenvman.2018.08.060

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

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

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

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

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

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

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

APÊNDICES

APÊNDICE A – Extração, digestão e tratamento das amostras

Extração (Protocolo de Extração – Wang 2006, adaptado)

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

REAGENTES NECESSÁRIOS

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

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

Tabela 2. Solução de precipitação (Wang, 2003)

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

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

Limpeza das amostras

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

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

Digestão

Reagentes

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

Procedimento

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

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

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

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

Dia seguinte

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

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

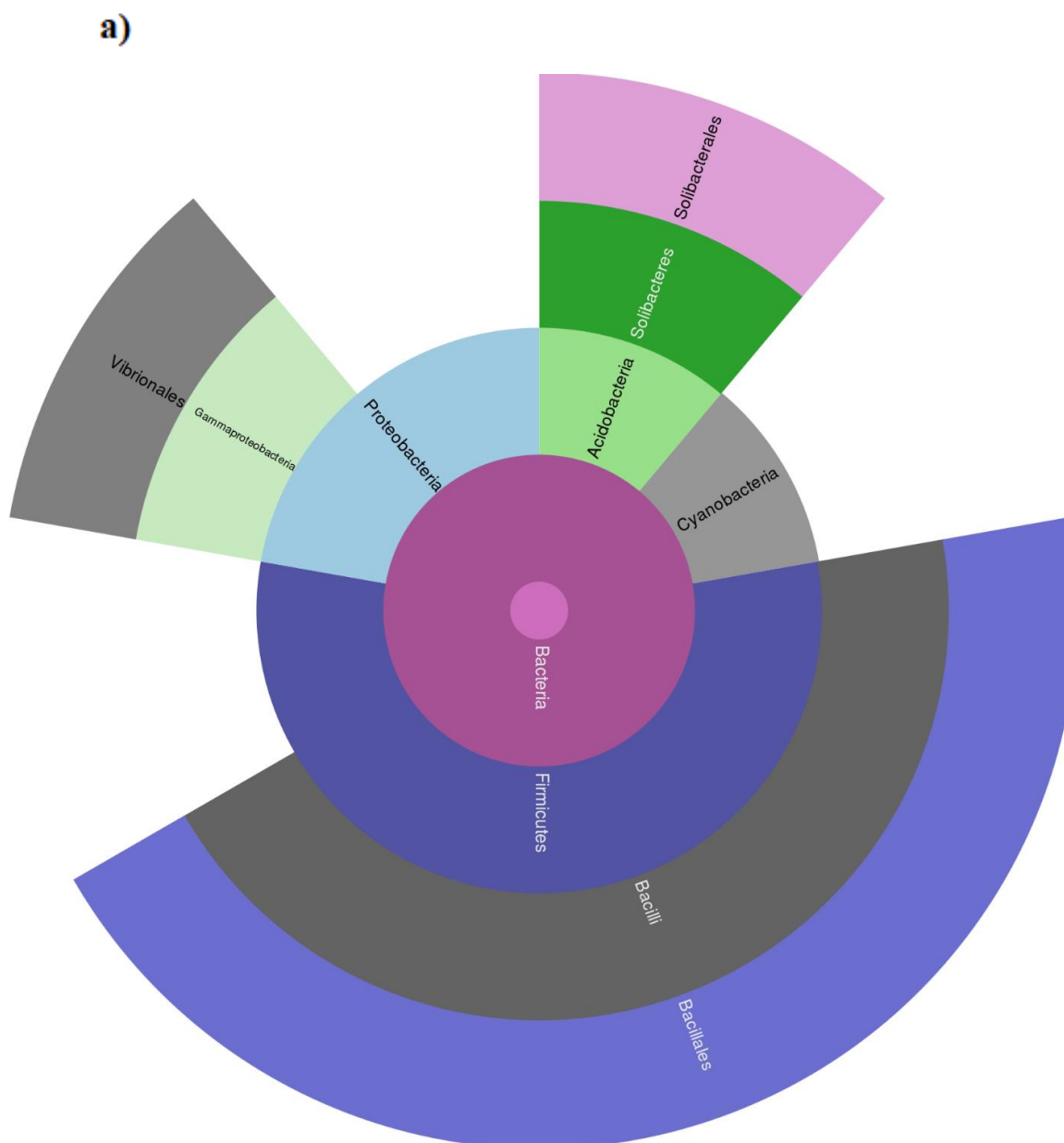
3. Centrifugar as amostras a 14000 rpm, 6 °C por 30 minutos.

4. Transferir o sobrenadante para o vial.

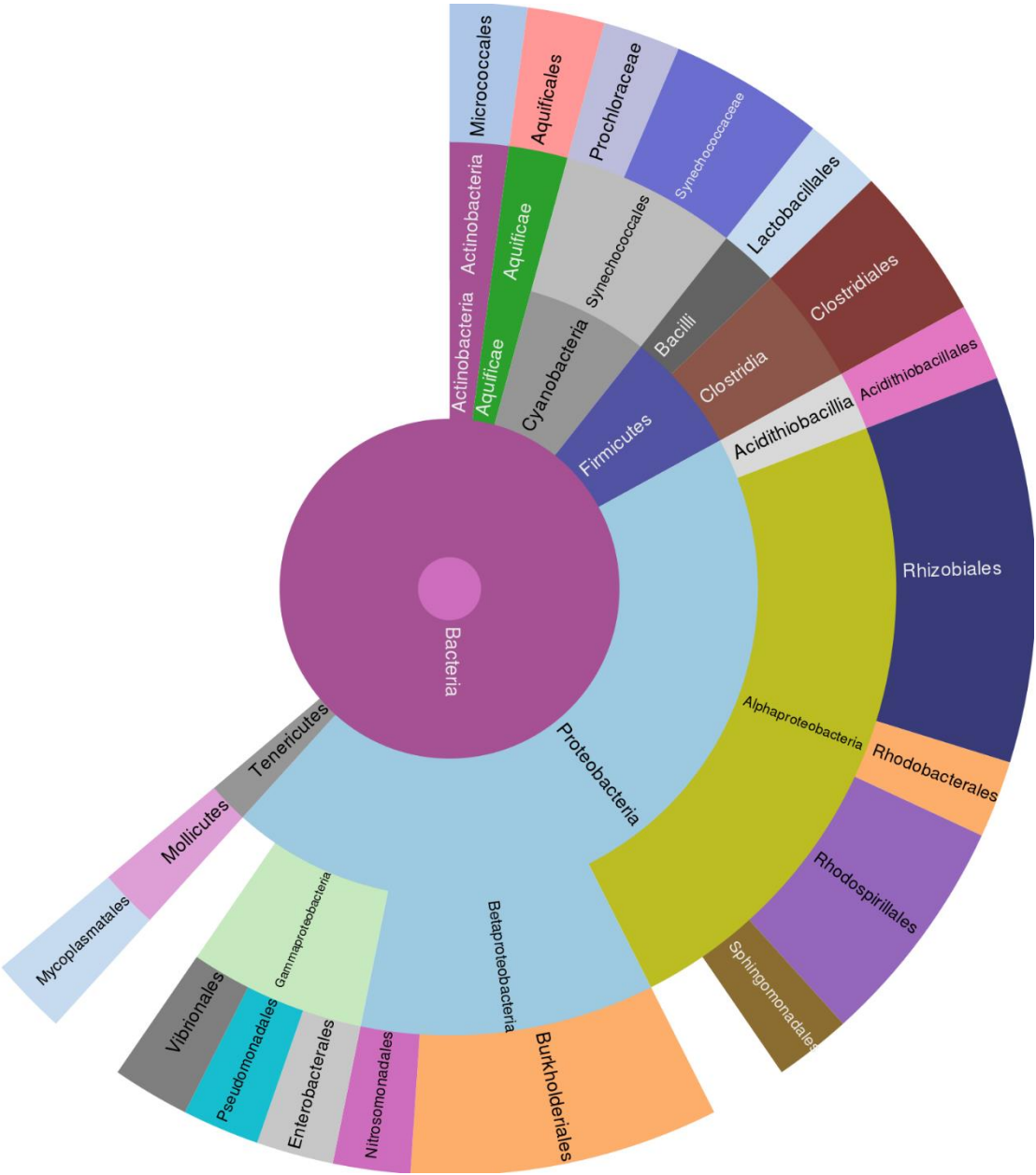
5. Aumentar o pH adicionando 5 μ L de 1 N NH_4OH para elevar o pH até 10, adicionar moderadamente mais deste reagente caso o pH não esteja em 10.

APÊNDICE B – Dados suplementares

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



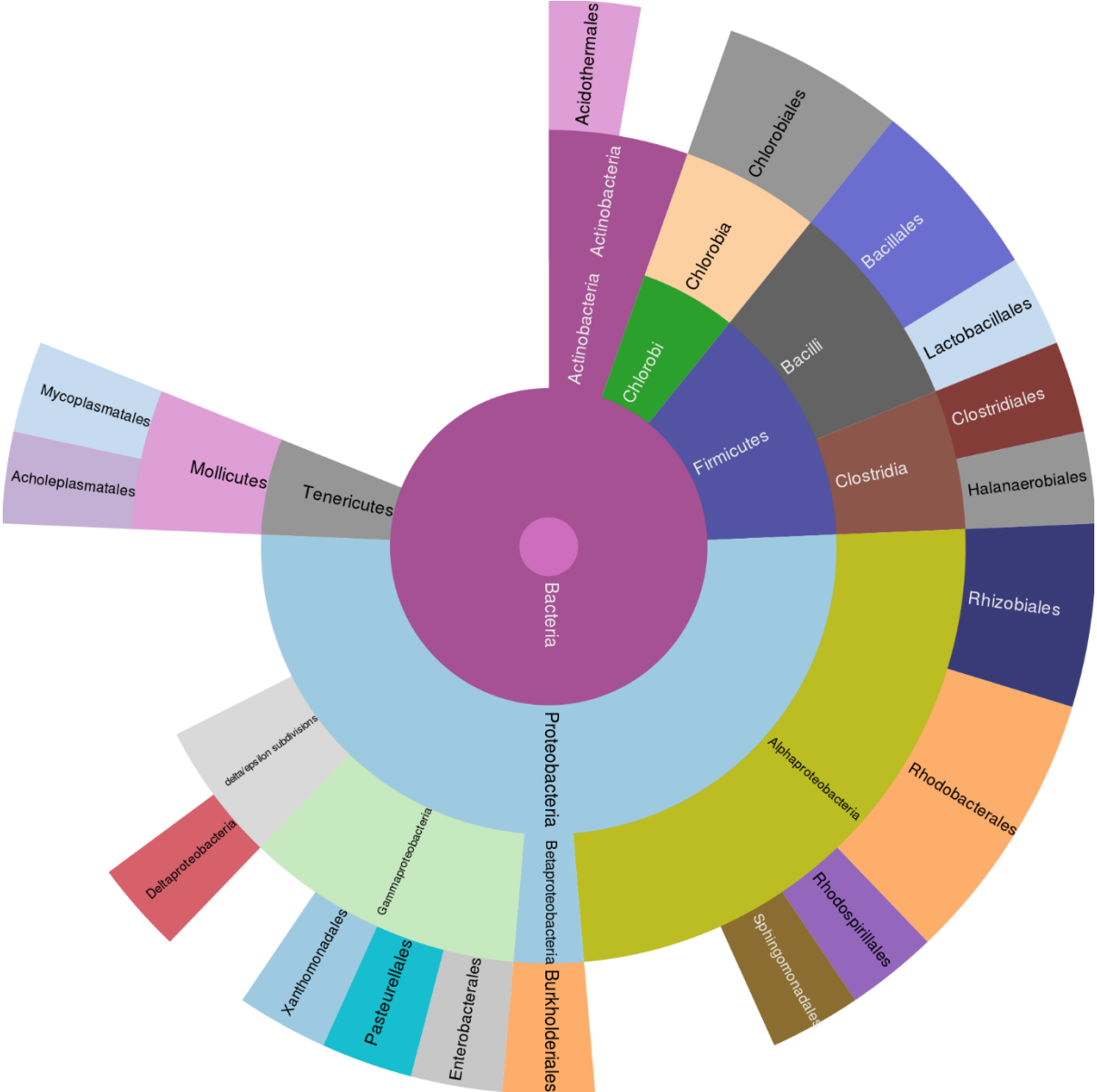
b)



c)



d)



e)



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

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

RA12 RA14 RI SN

30

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

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

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

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